

**Beeinflussung der heterotetrameren Struktur
der anti-apoptotischen Proteinkinase CK2
als potentielle pharmakologische Strategie**

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Michaela Steinkrüger

aus Leverkusen

Köln, 2017

Berichterstatter:

Prof. Dr. Karsten Niefind

Prof. Dr. Ines Neundorf

Tag der mündlichen Prüfung:

11.01.2017

Diese Doktorarbeit wurde ab Mai 2013 am Zentrum für Pharmakologie des Uniklinikums Köln unter der Anleitung durch Herrn Dr. rer. nat. Markus Pietsch und der formalen Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Karsten Niefind (Department für Chemie der Universität Köln) erarbeitet. Sie wurde im November 2016 an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln als Promotionsschrift eingereicht.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

"Development of a high-throughput screening-compatible assay to identify inhibitors of the CK2alpha/CK2beta interaction" Jennifer Hochscherf, Dirk Lindenblatt, Michaela Steinkrüger, Eungyoung Yoo, Özlem Ulucan, Stefan Herzig, Olaf-Georg Issinger, Volkhard Helms, Claudia Götz, Ines Neundorf, Karsten Niefind, Markus Pietsch *Anal Biochem* **2015**; 468:4–14.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karsten Niefind für die Bereitstellung dieses besonderen Projekts und die exzellente Betreuung über den gesamten Zeitraum dieser Arbeit. Ebenso möchte ich mich dafür bedanken, dass ich mich in den letzten Jahren durch diese Arbeit fachlich weiterentwickeln konnte und viel Neues lernen durfte.

Für die fruchtbare Kooperation mit Frau Prof. Ines Neundorf sowie die Übernahme des Zweitgutachtens möchte ich mich ebenso bedanken. Auch der freundlichen Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe für die Synthese der zyklischen Peptide und der tatkräftigen Unterstützung durch Stephanie Natividad-Tietz ist mein Dank geschuldet.

Ausdrücklich möchte ich auch Herrn Dr. Markus Pietsch danken, der dieses Projekt in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Karsten Niefind initiiert hat und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Dank schulde ich auch Dr. Jennifer Hochscherf und Dr. Alexander Schnitzler für ihre Hilfe bei der prokaryotischen Expression der Proteine. Jennifer Hochscherf gilt dabei im Besonderen mein Dank für die ausgezeichneten Vorarbeiten in meinem Projekt.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dirk Lindenblatt bedanken, der mit seiner Arbeit in seinen Projektmodulen und seiner Bachelor- und Masterarbeit einen Großteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ebenso Eungyoung Yoo für ihre exzellenten Vorarbeiten bezüglich der Synthese des fluoreszenzmarkierten Peptids.

Herrn Prof. Dr. Joachim Jose und Herrn Prof. Dr. Bernhard Wunsch möchte ich für die zur Verfügung gestellten Substanzen danken, insbesondere Lukas Kröger für die Synthese der W16-Substanzen.

Allen weiteren Mitarbeitern aller Arbeitsgruppen, die mich während meiner Arbeit fortlaufend unterstützt und mir zur Seite gestanden haben, möchte ich ebenfalls danken. Auch für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre die geschaffen wurde möchte ich mich bedanken, die die letzten Jahre zu einer sehr schönen Zeit gemacht hat.

Insbesondere hervorheben möchte ich hier meine Laborkollegen Ehab El-Awaad Christoph Hauser und Florian Dato, die mir während dieser Arbeit immer eine große Hilfe waren. Sowie Frau Vera Wiesmüller und Frau Doris Theisen, die sich bei Problemen immer Zeit genommen haben. Peter Skwara möchte ich für seine Hilfe bei den gentechnischen Arbeiten und die konstruktiven Gespräche während der Kaffeepausen danken. Weiterhin möchte ich Maria Bräutigam und Miriam Sheikh dafür danken, dass sie mir immer mit Rat und einem offenen

Ohr für meine Probleme zur Seite standen und einen Großteil dieser Arbeit mitkorrigiert haben. Ohne diese Beiden wäre diese Arbeit nicht in dieser Form möglich gewesen. Auch für die großartigen Erlebnisse außerhalb des Labors, bei denen mir beide zu sehr guten Freundinnen geworden sind möchte ich mich bedanken und hoffe, dass dies auch in der Zukunft der Fall sein wird.

Zuletzt möchte ich mich auch bei all meinen Freunden bedanken für ihre Unterstützung während der letzten Jahre bedanken, besonders Lars Ehrentraut für seine Korrekturarbeiten. Ebenso meiner Familie die mir während meiner gesamten Ausbildung bedingungslos den Rücken gestärkt hat.

Schlussendlich möchte ich noch einer besonderen Person danken, die mir gerade im für mich schweren letzten Jahr meiner Arbeit immer zur Seite stand. Dieser Dank gilt Thomas Altenburg dafür, dass er immer für mich da war und mir bei meinen Problemen tatkräftig geholfen hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Protein-Protein-Interaktionen (PPIs)	1
1.2	Eukaryotische Proteinkinasen	2
1.2.1	Eukaryotische Proteinkinasen und deren Regulation	2
1.2.2	Struktureller Aufbau von eukaryotischen Proteinkinasen	5
1.3	Proteinkinase-Inhibitoren	7
1.4	Die Proteinkinase CK2	9
1.4.1	Strukturelle Aspekte der CK2	11
1.4.2	Die katalytische Untereinheit CK2 α und ihr Paralogon CK2 α'	14
1.4.3	Die CK2 β -Untereinheit	15
1.5	CK2-Inhibitoren	18
1.5.1	ATP-kompetitive Inhibitoren	18
1.5.2	CK2-Inhibitoren, die nicht ATP-kompetitiv wirken	20
1.5.3	CK2 β -Untereinheit	21
2	Zielsetzungen	24
3	Theoretische Grundlagen	25
3.1	Detektion von Protein-Protein-Interaktionen	25
3.2	Theoretischer Hintergrund der Fluoreszenz-Anisotropie	26
3.2.1	Versuchsaufbau der Fluoreszenz-Anisotropie	26
3.3	Theoretischer Hintergrund zur Microscale Thermophorese	30
3.3.1	Grundlagen zur Thermophorese	30
3.3.2	Versuchsaufbau zur MST	31
3.3.3	Phasen der MST-Messung	32
3.3.4	Evaluierung der MST-Signale	34
3.3.5	Güte von MST-Messungen	35
4	Material und Methoden	40
4.1	Verwendete Materialien, Geräte und EDV-Systeme	40
4.1.1	Chemikalien	40

4.2	Materialien, Geräte und EDV-Systeme	42
4.2.1	Verwendete EDV-Systeme	44
4.3	Verwendete Puffer und Lösungen	45
4.4	Molekularbiologische Methoden	46
4.4.1	Verwendete Bakterienstämme	46
4.4.2	Oligonucleotide	46
4.4.3	PCR	47
4.4.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	48
4.4.5	Restriktionsverdau nach PCR	48
4.4.6	Restriktionsverdau des Vektors pV152 zur Ligation	49
4.4.7	Ligation	51
4.4.8	Gibson Assembly Reaktion	51
4.4.9	Transformation von elektrokompenten <i>E. coli</i> -Zellen	52
4.4.10	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	52
4.4.11	Plasmidpräparation im 1,5 ml Maßstab	53
4.4.12	Plasmidpräparation im 200 ml Maßstab	53
4.4.13	Sequenzierung.....	54
4.4.14	Transfektion mit Turbofect von CK2 α^{1-335} , CK2 α^{C336S}	55
4.4.15	Transfektion mit Lipofectamine® 2000 von CK2 β^{1-193} und CK2 β	55
4.5	Proteinbiochemische Methoden	56
4.5.1	Affinitätschromatographie mit Streptactin-Sepharose	57
4.5.2	Rekombinante Expression von CK2 α^{1-335} , CK2 α^{C336S} und CK2 β^{1-193} im 5 l Maßstab in <i>E. coli</i>	57
4.5.3	Rekombinante Expression von CK2 β^{1-193} mit N-terminalem Doppel-Streptag-II im 2l Maßstab	57
4.5.4	Lyse von Bakterien der rekombinanten Expression im 9 l Maßstab.....	58
4.5.5	Lyse von Bakterien der rekombinanten Expression im 2 l Maßstab.....	58
4.5.6	Kationenaustausch-/Affinitätschromatographie mit P11-Cellulose im Batch-Verfahren	58
4.5.7	Affinitätschromatographie mit Heparin.....	59

4.5.8	NiNTA-Affinitätschromatographie	59
4.6	Proteinanalytische Methoden	60
4.6.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	60
4.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	60
4.6.3	Western Blot	61
4.6.4	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	61
4.7	Peptidsynthese.....	63
4.7.1	Automatisierte Festphasensynthese von Peptiden mittels Roboter	64
4.7.2	Kupplung von Sarcosin	64
4.7.3	Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe	64
4.7.4	Markierung mit Carboxyfluorescein	65
4.7.5	Markierung mit Rhodamin B.....	65
4.7.6	Probeabspaltung	65
4.7.7	Vollabspaltung.....	66
4.7.8	Zyklisierung der Peptide mittels Wasserstoffperoxid	66
4.7.9	Festphasenextraktion	66
4.7.10	Reinigung der Peptide durch RP-HPLC	67
4.8	Peptidanalytik.....	67
4.8.1	Kaisertest.....	67
4.8.2	RP-HPLC gekoppelt mit ESI-MS	68
4.9	Fluoreszenz-Anisotropie-Assay.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4.9.1	K_D -Wert Bestimmung	69
4.9.2	Inhibitor-Screening	70
4.9.3	IC_{50} -Bestimmung.....	71
4.9.4	Bestimmung des Z' -Faktors.....	72
4.10	Microscale Thermophorese (MST)	72
4.10.1	Labeling mit NT™ Protein Labeling Kit RED-NHS.....	72
4.10.2	K_D -Wert Bestimmung	73
4.10.3	Kompetitionsexperimente.....	74
5	Ergebnisse	76

5.1	Transfektion, Expression und Reinigung	76
5.1.1	Expression und Reinigung von $hsCK2\alpha^{1-335}$ aus <i>E. coli</i>	76
5.1.2	Expression von $hsCK2\alpha^{C336S}$ in <i>E. coli</i>	76
5.1.3	Expression von $hsCK2\beta^{1-193}$ in <i>E. coli</i>	77
5.1.4	Entwicklung eines eukaryotischen Überexpressionssystems für $hsCK2\alpha_{HEK}$, $CK2\alpha^{1-335}_{HEK}$, $CK2\alpha^{C336S}$ und $hsCK2\beta^{1-193}_{HEK}$	77
5.1.5	Reinigung der $hsCK2\alpha_{HEK}$, $hsCK2\alpha^{1-335}_{HEK}$ mittels P11-Phosphocellulose und Heparin	81
5.1.6	Reinigung von $hsCK2\alpha_{HEK}$, $hsCK2\alpha^{1-335}_{HEK}$, $CK2\alpha^{C336S}$ und $hsCK2\beta^{1-193}_{HEK}$ mittels Streptactin- Sepharose	83
5.1.7	Expression einer $hsCK2\beta^{1-193}$ -Variante mit C-terminalem Doppel-Streptag-II in <i>E. coli</i>	87
5.2	Peptidsynthese	89
5.2.1	Synthese von Pc	89
5.2.2	Synthese von CF-Ahx-Pc	90
5.2.3	Synthese eines Rhodamin B-markierten Pc-Derivats	91
5.3	Fluoreszenz-Anisotropie-Assay	Fehler! Textmarke nicht definiert.
5.3.1	Bestimmung des K_D -Wertes von CF-Ahx-Pc	93
5.3.2	Bestimmung von IC_{50} -Werten und Berechnung der entsprechenden K_i -Werte von Pc und seinen Derivaten an $CK2\alpha^{1-335}$	94
5.3.3	Bestimmung des IC_{50} -Werts und Berechnung des K_i -Werts für Pc an $hsCK2\alpha^{C336S}$	97
5.3.4	Einfluss von gegen das aktive Zentrum von an $hsCK2\alpha^{1-335}$ gerichtete Substanzen auf die Bindung von CF-Ahx-Pc	97
5.3.5	Bestimmung des Z' -Faktors	100
5.3.6	Screening von Podophyllotoxin Indolo-Analoga auf ihre Fähigkeit CF-Ahx-Pc von $hsCK2\alpha^{1-335}$ zu verdrängen	101
5.3.7	Screening von Indeno[1,2- <i>b</i>]indol-Derivaten auf ihre Fähigkeit CF-Ahx-Pc von $hsCK2\alpha^{1-335}$ zu verdrängen	102
5.3.8	IC_{50} -Bestimmung für CM3041A und CM3094A	103
5.4	Microscale Thermophorese	104

5.4.1	Bestimmung der K_D -Werte für die Bindung von $hsCK2\beta^{1-193}$ an $hsCK2\alpha^{1-335}$ und $hsCK2\alpha^{C336S}$ aus <i>E. coli</i>	104
5.4.2	Bestimmung der K_D -Werte für die Bindung von $hsCK2\beta^{1-193}$ (<i>E. coli</i>) an $hsCK2\alpha_{HEK}$, $hsCK2\alpha^{1-335}_{HEK}$ und $hsCK2\alpha^{C336S}_{HEK}$ aus HEK293-EBNA-Zellen.....	105
5.4.3	Bestimmung der K_D -Werte für die Bindung von $hsCK2\beta^{1-193}$ an $hsCK2\alpha^{1-335}$ in Anwesenheit von Pc und seinen Derivaten.....	106
5.4.4	Bestimmung der K_D -Werte für die Bindung von $hsCK2\beta^{1-193}$ an $hsCK2\alpha^{1-335}$ in Anwesenheit von W16 und seiner Derivate	107
5.4.5	Bestimmung der K_D -Werte für die Bindung von $hsCK2\beta^{1-193}$ an $hsCK2\alpha^{1-335}$ in Anwesenheit von Indeno[1,2- <i>b</i>]indol-Derivaten	110
6	Diskussion.....	112
6.1	Expression und Reinigung der verschiedenen CK2-Untereinheiten.....	112
6.2	Synthese der zyklischen Peptide.....	112
6.3	Assayentwicklung.....	118
6.3.1	Fluoreszenz-Anisotropie-Assay	119
6.3.2	MST-Assay	120
6.4	Bindungsstudien mit dem zyklischen Peptid Pc und seiner Derivate	121
6.5	Bindungsstudien mit Inhibitoren des Podophyllotoxin Indolo-Analoga Typs.....	124
6.6	Bindungsstudien mit Inhibitoren des Indeno[1,2- <i>b</i>]indol-Typs.....	127
6.7	Bestimmung der K_D -Werte der Interaktion von $hsCK2\beta^{1-193}$ mit in HEK293-EBNA-Zellen exprimierten katalytischen CK2-Untereinheiten	133
7	Ausblick.....	136
8	Literaturverzeichnis	Fehler! Textmarke nicht definiert.
9	Anhang.....	154
9.1	Expressionsvektoren.....	154
9.1.1	pT7-7	154
9.1.2	pETDuet-1.....	154
9.1.3	pV152	155
9.2	Analytische Agarosegele nach Restriktionsverdau der Plasmidpräparation.....	156
9.2.1	Restriktionsverdau zur Kontrolle des $hsCK2\alpha_{HEK}$ -Konstrukts.....	156
9.2.2	Restriktionsverdau zur Kontrolle des $hsCK2\alpha^{1-335}_{HEK}$ -Konstrukts	157

9.2.3	Restriktionsverdau zur Kontrolle des $hsCK2\beta^{1-193}_{Hek}$ -Konstrukts	158
9.2.4	Restriktionsverdau zur Kontrolle des $hsCK2\alpha^{C336S}_{Hek}$ -Konstrukts	159

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Reaktionsverlauf der Proteinphosphorylierung:	3
Abb. 2 Das humane Kinom:.....	4
Abb. 3 Nahansicht der Hauptunterschiede zwischen DFG-in and DFG-out Konformation.	7
Abb. 4 Pharmakophor-Modell für Proteinkinase-Inhibitoren:.....	8
Abb. 5 Die CMGC-Familie:	10
Abb. 6 Substraterkennungsmotiv:.....	11
Abb. 7 Kristallstruktur des CK2-Holoenzym:	12
Abb. 8 Strukturen der verschiedenen postulierten CK2 Oligomere:	14
Abb. 9 Struktur der CK2 α :	14
Abb. 10 Struktur CK2 β :	16
Abb. 11 Schematische Darstellung verschiedener Angriffspunkte von CK2-Inhibitoren:	18
Abb. 12 ATP-kompetitive CK2 Inhibitoren.....	19
Abb. 13 Peptid P15:	20
Abb. 14 Struktur von Polyoxometallate:.....	21
Abb. 15 Struktur des Peptids P1:.....	21
Abb. 16 Sequenz des zyklischen Peptids Pc:	22
Abb. 17 Struktur des Inhibitors W16:	23
Abb. 18 Schematischer Versuchsaufbau für die Fluoreszenz-Anisotropie-Messung:.....	29
Abb. 19 Schematische Darstellung der Reaktion bei der Fluoreszenz-Anisotropie:	30
Abb. 20 Experimenteller Aufbau der MST-Messung:	32
Abb. 21 Typisches MST-Signal:	34
Abb. 22 Verlust des Fluoreszenzsignals:	38
Abb. 23 Aggreation in MST-Kurven	39
Abb. 24 Schematische Darstellung der Reaktionen des Gibson Assembly Kits.....	52
Abb. 25 Reaktionsschema Kaisertest.....	68
Abb. 26 SDS-PAGE einer <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> -Reinigung:.....	76
Abb. 27 SDS-PAGE einer <i>hsCK2α^{C336S}</i> -Reinigung:	77
Abb. 28 SDS-PAGE der <i>hsCK2α_{HEK}</i> nach Heparin und P11-Phosphocellulose:	82
Abb. 29 Western Blot der <i>hsCK2α_{HEK}</i> nach Heparin:	83
Abb. 30 SDS-Page der CK2 α ¹⁻³³⁵ _{HEK} nach P11-Phosphocellulose und Heparin:	83
Abb. 31 SDS-Page der in HEK293-EBNA-Zellen exprimierten katalytischen CK2-Untereinheiten:.....	84
Abb. 32 SDS-Page der <i>hsCK2β¹⁻¹⁹³_{HEK}</i> aus HEK293-EBNA-Zellen im Vergleich zur <i>hsCK2β¹⁻¹⁹³</i> aus <i>E. coli</i> :.....	85
Abb. 33 Western Blot der <i>hsCK2α_{HEK}</i> , CK2 α ¹⁻³³⁵ _{HEK} , CK2 α ^{C336S}	85
Abb. 34 Western-Blot der <i>hsCK2β¹⁻¹⁹³_{HEK}</i> :	86

Abb. 35 ELISA zum Nachweis mit spezifischen Antikörpern gegen das jeweilige Protein:....	86
Abb. 36 ELISA zum Nachweis des Doppel-Streptag-II:	87
Abb. 37 SDS-Page der <i>hsCK2β¹⁻¹⁹³</i> aus <i>E. coli</i> mit und ohne N-terminalen Doppel-Streptag-II:	88
Abb. 38 Western Blot der <i>hsCK2β¹⁻¹⁹³</i> aus <i>E. coli</i> mit und ohne N-terminalem Doppel-Streptag-II:.....	88
Abb. 39 RP-HPLC-Chromatogramm und ESI-Massenspektrum des zyklischen Peptids Pc: 89	
Abb. 40 RP-HPLC-Chromatogramm und ESI-Massenspektrum des zyklischen CF-Ahx-Pc: 90	
Abb. 41 RP-HPLC-Chromatogramm und ESI-Massenspektrum des linearen Peptids Rhodamin B-Sar-Ahx-Pc:	92
Abb. 42 RP-HPLC-Chromatogramm und ESI-Massenspektrum des zyklischen Peptids Rhodamin B-Sar-Ahx-Pc:	92
Abb. 43 FA-Messungen zur Interaktion von CF-Ahx- Pc mit <i>CK2α¹⁻³³⁵</i> und <i>CK2α^{C336S}</i> – Bestimmung des <i>K_D</i> -Werts:	94
Abb. 44 Strukturformeln des zyklischen Peptids Pc und seiner Derivate.	95
Abb. 45 Bestimmung des <i>IC₅₀</i> -Werts der zyklischen Peptide Pc, I-Pc und Cl-Pc:	96
Abb. 46 ITC-Graphen und daraus ermittelte <i>K_D</i> -Graphen der zyklischen Peptide Pc, I-Pc und Cl-Pc.	96
Abb. 47 Bestimmung des <i>IC₅₀</i> -Werts des zyklischen Peptids Pc an <i>hsCK2α^{C336S}</i> :	97
Abb. 48 FA-Messungen in Anwesenheit des ATP-kompetitiven Inhibitors CX-4945:	98
Abb. 49 FA-Messungen in Anwesenheit des Substratpeptids RRRDDDSDDD:	99
Abb. 50 Bestimmung des <i>Z'</i> -Faktors:.....	100
Abb. 51 Strukturformeln der Substanz W16 und ihrer Derivate.....	101
Abb. 52 Strukturformeln der Substanzen vom Indeno[1,2- <i>b</i>]indol-Typ.	103
Abb. 53 <i>IC₅₀</i> -Bestimmung für die Substanzen CM3041A (rot) und CM3094A (schwarz).....	104
Abb. 54 <i>K_D</i> -Kurven der Interaktionen von <i>hsCK2β¹⁻¹⁹³</i> mit <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> (schwarz) und <i>hsCK2α^{C336S}</i> (rot):	105
Abb. 55 <i>K_D</i> -Kurven der Interaktion von <i>hsCK2β¹⁻¹⁹³</i> (20 nM) mit <i>hsCK2α_{HEK}</i> (schwarz), <i>CK2α¹⁻³³⁵_{HEK}</i> (rot) (A) und <i>hsCK2α^{C336S}_{HEK}</i> (B):.....	106
Abb. 56 <i>K_D</i> -Kurve der <i>hsCK2α¹⁻³³⁵/hsCK2β¹⁻¹⁹³</i> -Interaktion in Anwesenheit der zyklischen Peptide:.....	107
Abb. 57 Bestimmung des <i>K_D</i> -Werts der Interaktion von <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> und <i>hsCK2β¹⁻¹⁹³</i> in Anwesenheit von 1% DMSO:	108
Abb. 58 <i>K_D</i> -Kurven der potentesten Inhibitoren der W16 Analoga:	109
Abb. 59 <i>K_D</i> -Kurven der potentesten Inhibitoren vom Indeno[1,2- <i>b</i>]indol-Typ :	111
Abb. 60 <i>K_D</i> -Kurve der Substanz 6b:.....	111

Abb. 61 K_D -Kurven der $hsCK2\alpha^{1-335}$ und CF-Ahx-Pc mit und ohne Präinkubation im FA-Assay (A) und ITC-Messung der $hsCK2\alpha^{1-335}$ und CF-Ahx-Pc (B).	120
Abb. 62 Interaktion des Phe 190 von Pc mit CK2 α mittels eines Wassermoleküls.	124
Abb. 63 Struktur des Naturstoffs Podophyllotoxin	127
Abb. 64 Strukturformel des Polylysins	131
Abb. 65 Mechanismus für die Stimulation von CK2 durch Polyamine:	132
Abb. 66 K_D -Wert Bestimmung für die Interaktion von CF-Ahx-PC mit CK2 α^{1-193} (<i>E. coli</i>) bzw. CK2 α^{1-335}_{HEK} (HEK293-EBNA-Zellen):	134
Abb. 67 Aufbau des Expressionsvektors pT7-7	154
Abb. 68 Aufbau des Expressionsvektors pETDuet-1	155
Abb. 69 Aufbau des pCEP4	156
Abb. 70 Restriktionsverdau der Plasmidpräparation des $hsCK2\alpha_{HEK}$ -Konstrukts.	157
Abb. 71 Restriktionsverdau der Plasmidpräparation des $hsCK2\alpha^{1-335}_{HEK}$ -Konstrukts.	158
Abb. 72 Restriktionsverdau der Plasmidpräparation des $hsCK2\beta^{1-193}_{HEK}$ -Konstrukts.	159
Abb. 73 Restriktionsverdau der Plasmidpräparation des $hsCK2\alpha^{1-336S}_{HEK}$ -Konstrukts.	160

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Biophysikalische Messmethoden zur Analyse von PPI	26
Tab. 2 Enzyme und Kits	40
Tab. 3 Zellkulturmaterialien	41
Tab. 4 Antikörper	41
Tab. 5 Sonstige Chemikalien	42
Tab. 6 Verwendete Geräte	42
Tab. 7 Verwendete Materialien	43
Tab. 8 Verwendete EDV-Geräte	44
Tab. 9 Verwendete Puffer und Zusammensetzung	45
Tab. 10 Oligonucleotide und ihre Sequenzen für die Klonierung.	46
Tab. 11 Oligonucleotide und ihre Sequenzen für die Sequenzierung	47
Tab. 12 PCR-Programm für die Amplifikation von DNA.	48
Tab. 13 Pipettierschema für die PCR zur Sequenzierung	55
Tab. 14 PCR-Programm zur PCR für die Sequenzierung	55
Tab. 15 Zusammensetzung Trenngel	61
Tab. 16 Zusammensetzung Sammelgel	61
Tab. 17 Proteine und ihre Konzentration im ELISA	62
Tab. 18 Proteine und ihre Konzentration im ELISA	63
Tab. 19 Pipettierschema für die K_D -Wert Bestimmung von CF-Ahx-Pc	70
Tab. 20 Pipettierschema für das Inhibitor-Screening.	70
Tab. 21 Pipettierschema IC_{50} -Bestimmung mit $CK2\alpha^{1-335}$	71
Tab. 22 Pipettierschema IC_{50} -Bestimmung mit $CK2\alpha^{C336S}$	71
Tab. 23 Konzentrationsbereiche der im MST getesteten katalytischen CK2-Untereinheiten.	74
Tab. 24 Mikroskopiebilder von HEK293-EBNA-WT Zellen (untransfiziert)	79
Tab. 25 Mikroskopiebilder der transfizierten HEK293-EBNA-Zellen	81
Tab. 26 Charakterisierung des zyklischen Peptids PC nach der Zyklisierung.	89
Tab. 27 Charakterisierung des zyklischen CF-Ahx-Pc	90
Tab. 28 Charakterisierung des linearen und zyklischen Rhodamin B-Sar-Ahx-Pc:	91
Tab. 29 K_D -Werte für die Interaktion von CF-Ahx-Pc und $CK2\alpha^{1-335}/CK2\alpha^{C336S}$	93
Tab. 30 IC_{50} -Werte des zyklischen Peptids Pc und seiner Derivate.	95
Tab. 31 Berechnete K_I -Werte der zyklischen Peptide.	97
Tab. 32 Prozentuale FA des Systems $hsCK2\alpha^{1-335}/CF-Ahx-Pc$ in Anwesenheit von W16 und seiner Derivate.	102
Tab. 33 Prozentuale FA des Systems $hsCK2\alpha^{1-335}/CF-Ahx-Pc$ in Anwesenheit der Indeno[1,2- <i>b</i>]indole	103
Tab. 34 IC_{50} -Werte der Substanzen CM3041A und CM3094A.	103

Tab. 35 K_D -Werte für die Bindung von fluoreszenzmarkierter $hsCK2\beta^{1-193}$ an $hsCK2\alpha^{1-335}$ und $hsCK2\alpha^{C336S}$	104
Tab. 36 K_D -Werte für die Bindung von fluoreszenzmarkierter $hsCK2\beta^{1-193}$ an die in HEK293-EBNA-Zellen exprimierten CK2 α -Varianten.	105
Tab. 37 K_D -Werte der $hsCK2\beta^{1-193}/hsCK2\alpha^{1-335}$ -Interaktion in Anwesenheit der zyklischen Peptide und daraus berechneten K_i -Werte.	106
Tab. 38 K_D -Werte in Anwesenheit von W16 und seiner Derivate.	108
Tab. 39 K_D -Werte in Anwesenheit von Indeno[1,2- <i>b</i>]indol-Derivaten	110
Tab. 40 Berechnete Größen der Banden des $hsCK2\alpha_{Hek}$ -Konstrukts nach Restriktionsverdau mit EcoRV	157
Tab. 41 Berechnete Größen der Banden des $hsCK2\alpha^{1-335}_{Hek}$ -Konstrukts nach Restriktionsverdau mit EcoRV.....	158
Tab. 42 Berechnete Größen der Banden des $hsCK2\beta^{1-193}_{Hek}$ -Konstrukts nach Restriktionsverdau mit PstI	159
Tab. 43 Berechnete Größen der Banden des $hsCK2\alpha^{C336S}_{Hek}$ -Konstrukts nach Restriktionsverdau mit PstI	160

Zusammenfassung

Die Proteinkinase CK2 ist eine hochkonservierte Serin-/Threoninkinase, welche ubiquitär exprimiert wird und gehört zur CMGC-Familie der eukaryotischen Proteinkinasen (ePKs). Bei der CK2 handelt es sich um einen heterotetrameren Komplex, welcher aus einem Dimer zweier regulatorischer Untereinheiten (CK2 β) besteht, an welches sich je eine katalytische Untereinheit (CK2 α) anlagert. Die CK2 α -Untereinheit ist konstitutiv aktiv, auch ohne die Assoziation mit CK2 β und es sind bis heute keine sekundären Modifikationen für die *in vivo* Regulierung der CK2-Aktivität bekannt. Die Assoziation mit CK2 β sorgt jedoch für eine Veränderung der Substratspezifität sowie eine Erhöhung der Thermostabilität und Aktivität. Weiterhin ist die CK2 pleiotrop und hat ein breites Substratspektrum mit bis jetzt mehr als 300 bekannten Substraten. Aufgrund der Pleiotropie ist bis heute noch keine genaue Einordnung der CK2 in die bisher bekannten Signaltransduktionsnetzwerke erfolgt. Bekannt ist jedoch, dass sie in vielen fundamentalen Zellprozessen involviert ist. Hierzu zählen die Regulierung des Zellzykluses, des zirkadianen Rhythmus, der Genexpression, des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung, der Embryogenese sowie der Apoptose (wobei CK2 anti-apoptotisch wirkt). Die CK2 steht im Zusammenhang mit einer Vielzahl von Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson, entzündlichen und vaskulären Erkrankungen, sowie Erkrankungen der Skelettmuskulatur und des Knochengewebes. Vor allem aber steht die Überexpression in einer Vielzahl von Tumoren im Fokus, welche die CK2 zu einer wichtigen Zielstruktur für die Krebstherapie zur Entwicklung kleiner Moleküle zur Inhibition der Aktivität macht.

Für die Entwicklung von Inhibitoren bietet die CK2 mehrere Angriffspunkte, welche zum einen gegen das Holoenzym und zum anderen gegen die beiden Untereinheiten gerichtet sind. Für die CK2 α zählen hierzu Inhibitoren, welche die ATP- oder Substratbindungsstelle angreifen sowie allosterische Inhibitoren. Die CK2 β -Untereinheit ist für die Rekrutierung von einigen Substraten notwendig und dies kann als Angriffspunkt für die Entwicklung von Inhibitoren, die an der Rekrutierungsstelle binden, genutzt werden. Das CK2-Holoenzym bietet als Angriffspunkt für Inhibitoren die CK2 α /CK2 β -Interaktion. Diese kann durch kleine organische Moleküle sowie Peptide gestört werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich nach solchen Molekülen gesucht, welche die CK2 α /CK2 β -Interaktion negativ beeinflussen. Für die Identifikation von neuen Inhibitoren wurde ein Fluoreszenz-Anisotropie (FA)-Assay sowie Microscale Thermophorese (MST)-Messungen herangezogen. Validiert wurden die hier erhobenen Ergebnisse mit bereits unternommenen kalorimetrischen Untersuchungen. Zunächst wurden dafür Dissoziationskonstanten K_D mit dem jeweiligen Interaktionspartner ermittelt. Im FA-Assay wurde hierfür das CK2 β -nachahmende zyklische Peptid Pc mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und als Interaktionspartner für die CK2 α verwendet. Für das zyklische Peptid Pc

konnte bereits sowohl mit einem radiometrischen Assay, als auch strukturebiologisch die Interaktion mit CK2 α aufgeklärt werden. Für die MST Messungen wurde die CK2 direkt fluoreszenzmarkiert. Beide Methoden lieferten dabei ähnliche Ergebnisse wie bereits in der Literatur beschrieben, auch für die Interaktion von CK2 β mit der paralogen CK2 α' . Mittels der beiden Assays konnten neue Derivate des zyklischen Peptids Pc als potente Inhibitoren der CK2 α /CK2 β -Interaktion identifiziert werden. Weiterhin konnten durch die MST Messungen die Werte für den aus der Literatur bekannten Inhibitor W16 reproduziert und Derivate von diesem als Inhibitoren identifiziert werden. Eine weitere interessante Beobachtung konnte mit Substanzen vom Indeno[1,2-*b*]indol-Typs bei den MST-Messungen gemacht werden. Diese sind eigentlich als ATP-kompetitive Inhibitoren der CK2 α bekannt. Während drei der Substanzen vom Indeno[1,2-*b*]indol-Typ einen inhibitorischen Effekt auf die CK2 α /CK2 β -Interaktion hatten, zeigten die restlichen Substanzen eine Verstärkung der Affinität zwischen CK2 α und CK2 β .

Die vorliegende Arbeit beschreibt weiterhin die Etablierung eines eukaryotischen Überexpressionsystems für die CK2-Untereinheiten, bei welchem die Proteine in den Zellkulturüberstand sekretiert und mittels eines fusionierten doppel-Streptag-II gereinigt werden. Durch die Transfektion von HEK293-EBNA-Zellen konnte eine gesteigerte Proliferation für CK2 α und für eine CK2 α -Mutante beobachtet werden. Zellen, die mit einer CK2 β -Mutante transfiziert worden waren, zeigten ein gehemmtes Wachstum, ähnlich wie bereits bei der Hefe *S. Pombe* und bei der Überexpression in chinesischen Hamster Ovarienzellen (CHO-Zellen) und in 3T3 L1 Zellen (Murine Fibroblasten) gezeigt wurde. Es konnten CK2 α , CK2 α^{1-335} , CK2 α^{C336S} sowie CK2 β^{1-193} aus dem Zellkulturüberstand der HEK293-EBNA-Zellen gereinigt und isoliert werden. Für die katalytischen CK2-Untereinheiten konnten Bindungsaffinitäten mit *hs*CK2 β^{1-193} aus *E. coli* mit dem neu entwickelten MST-Assay ermittelt werden.

Abstract

Protein kinase CK2 is a highly conserved serine/threonine-kinase with ubiquitous expression. This kinase belongs to the family of CMGC kinases of the eukaryotic protein kinases. CK2 is a heterotetrameric complex, which consists of a dimer of two regulatory subunits (CK2 β). Each of those regulatory subunits has a catalytic subunit (CK2 α) attached to it. The CK2 α subunit is constitutively active even without association to the CK2 β subunit. To date, there are no secondary modifications for *in vivo* regulation of CK2 activity known. However, the association with CK2 β induces changes in the substrate specificity as well as enhances the thermostability and activity. Furthermore, CK2 is a pleiotropic protein kinase with a broad substrate spectrum. To date, there are more than 300 substrates known. Due to its pleiotropy a possible integration into cellular signaling pathways and regulatory networks has been difficult. However, it is

known that CK2 plays a role in a variety of fundamental cellular processes, i.e. the regulation of the cell cycle, the circadian rhythm, gene expression, cell growth and differentiation, embryogenesis and apoptosis with anti-apoptotic effects being ascribed to it. CK2 is associated with a vast amount of human diseases like Alzheimer and Parkinson as well as vascular diseases and diseases of the skeletal muscles and bone tissue. However, most attention has been focused on CK2's overexpression in a vast variety of human tumors, thus, making CK2 a relevant target for the development of small molecules for the inhibition of its activity as anti-cancer agents.

CK2 offers several target sites for the development of new inhibitors. On the one hand, inhibitors may target the holoenzyme and on the other hand they may be directed against one of the two subunits. To date, inhibitors interacting with the ATP-binding or the substrate-binding site of the CK2 α subunit are known. However, the possibility of an allosteric inhibition targeting the CK2 α subunit has not been explored extensively. The CK2 β subunit is necessary for the recruitment of several substrates. There is a binding site at the N-terminal domain of CK2 β which is feasible for the development of new inhibitors. Therefore, targeting the CK2 α /CK2 β -interaction site of the CK2 holoenzyme represents a new approach to inhibition of CK2. Currently, there are some small organic molecules as well as peptides known which interrupt this interaction.

The presented work focuses mainly on molecules interrupting the CK2 α /CK2 β -interaction. In order to identify potential inhibitors, fluorescence anisotropy (FA) assays as well as Microscale Thermophoresis measurements were used as methods of choice. The here ascertained results of both methods were validated by already performed Isothermal Titration calorimetry measurements. Initially, the dissociation constants K_D were determined with the respective interaction partner. A fluorescence labeled version of the CK2 β -mimicking cyclic peptide PC was used for the FA assay. This peptide has already been identified to be CK2 β competitive by a radiometric assay as well as with crystallographic methods. For MST measurements the CK2 β -subunit was labeled directly with a fluorescent dye. The results for the obtained K_D values were in good agreement with literature data and could also be confirmed for the paralogous CK2 α' . Applying both methods, new derivatives of the cyclic peptide PC could be identified as potent inhibitors of the CK2 α /CK2 β -interaction. Furthermore, literature data for the chemical inhibitor W16 could be reproduced via MST. Moreover, derivatives of W16 were identified as new inhibitors. Interestingly, the substances of the indeno[1,2-*b*]indol-type that has been identified as an inhibitor of the CK2 α /CK2 β -interaction by means of MST measurements is also known to be an ATP-competitive inhibitor. Strikingly, only three compounds have shown to interfere with the CK2 α /CK2 β -interaction while the other substances exhibited an intensification of the affinity of the two subunits.

Furthermore, the presented work includes the establishment of a eukaryotic overexpression system for the CK2 subunits. Utilizing this system, the proteins were secreted into the cell culture supernatant and purified by a fused double Streptag II. HEK293-EBNA cells transfected with either CK2 α full-length or a C-terminal deletion mutant of CK2 α showed an increased proliferation. In contrast, cells transfected with a C-terminal deletion mutant of CK2 β exhibited a decreased growth. Similar effects were observed for overexpression in yeast (*S. Pombe*), Chinese hamster ovary cells (CHO-cells) and 3T3 L1 cells (murine fibroblasts). Successful purification and isolation from HEK293-EBNA cell supernatant was achieved for the subunits CK2 α ¹⁻³³⁵, CK2 α ^{C336S} as well as CK2 β ¹⁻¹⁹³. For the catalytic subunits the determination of binding affinities with *hsCK2 β ¹⁻¹⁹³* from *E. coli* with the new MST assay was possible.

1 Einleitung

1.1 Protein-Protein-Interaktionen (PPIs)

Protein-Protein-Interaktionen (PPIs), wie die Wechselwirkungen zwischen isolierten Proteinen bezeichnet werden, spielen eine wichtige Rolle in allen biologischen Prozessen. Hierzu zählen Metabolismus, Transportvorgänge, strukturelle Organisation, Signaltransduktion, Zellzyklus, Immunantwort und Gentranskription [1]. Proteine bilden dabei sowohl Hetero- als auch Homokomplexe aus. Diese werden weiterhin in obligatorische und nicht obligatorische Komplexe unterschieden, wobei die obligatorischen Komplexe meist permanenter Natur sind [2]. Die zugrunde liegenden Wechselwirkungen bei PPIs sind meist nichtkovalenter Natur. Das bedeutet, dass es sich um Van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Interaktion von hydrophoben Aminosäuren und elektrostatische Wechselwirkungen handelt.

Durch die Zuordnung bzw. Kartierung von Proteinnetzwerken erhofft man sich die Organisation des Proteoms aufklären zu können. Dafür erfolgt die systematische Analyse von PPIs, zum einen durch die Proteomik und zum anderen durch das Erfassen biophysikalischer Daten [3].

PPIs sind von verschiedenen Faktoren abhängig. Sie lassen sich beispielsweise durch die lokale Konzentration der Proteine beeinflussen, welche abhängig vom Expressionslevel des jeweiligen Proteins, der Sekretion, der Degeneration, Diffusion und der Membranverankerung des Proteins abhängig ist [2]. Die Proteinkonzentration hat somit auch einen Einfluss darauf, ob es überhaupt zu einem Kontakt der Interaktionsflächen der PPI kommt. Dies ähnelt der Reaktionsgeschwindigkeit chemischer Reaktionen, die umso höher ist, je höher die Konzentration der Ausgangsstoffe ist. Die Begründung hierfür liegt darin, dass in diesem Fall die Wahrscheinlichkeit höher ist, dass zwei Teilchen zusammenstoßen und miteinander reagieren können. Außerdem können auch sogenannte Effektormoleküle, wie ATP oder Ca^{2+} , einen Einfluss auf PPIs haben, weiterhin die Änderung physiologischer Bedingungen sowie kovalente Modifikationen [2].

Ein weiterer wichtiger Faktor bei PPIs ist die Interaktionsfläche zwischen den Proteinen. Dabei spielt nicht nur die Größe eine Rolle, sondern auch die Komplementarität der Flächen. Die geometrischen und physikochemischen Eigenschaften der Interaktionsfläche lassen auch Rückschlüsse auf die Stabilität des Komplexes zu. Oft ist es aber so, dass die Größe der Interaktionsfläche mit der Stabilität bzw. der Stärke des Komplexes korreliert [4].

PPIs sind für die Forschung von Interesse, um zum einen, wie bereits erwähnt, die Organisation des Proteoms besser zu verstehen. Zum anderen ist es so, dass wenn diese strengen Regulationsmechanismen in Unordnung geraten, die PPIs meistens fehlerbehaftet

sind. Deswegen ist es nicht nur von Interesse die Organisation der PPIs besser zu verstehen, sondern auch die Möglichkeiten kennenzulernen, diese zu stabilisieren, zu verhindern oder auch aufzubrechen, um letztendlich Arzneimittel zu entwickeln, welche die fehlerhaften PPIs wieder korrigieren [5]. Hierzu wird nicht nur in chemischen Bibliotheken, sondern auch *in silico* mittels computergestützten Methoden nach solchen Substanzen gesucht [6]. In dieser Arbeit wurde von der Struktur der Interaktionsfläche ein kurzes Peptid abgeleitet genutzt, welches mit dem natürlichen Bindungspartner konkurriert. Dieses wurde durch *Laudet et al.* identifiziert [7,8]. Wie diese Interaktionen detektiert werden können, ist unter 3.1 nachzulesen.

1.2 Eukaryotische Proteinkinasen

1.2.1 Eukaryotische Proteinkinasen und deren Regulation

Die Phosphorylierung von Proteinen ist eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen zur Steuerung nahezu aller fundamentalen zellulären Prozesse. Hierzu zählen Transkription, Zellzyklus, Differenzierung, Proliferation, Wahrnehmung und Reaktion auf äußere Reize, Immunantwort und Apoptose. Enzyme, die diese Reaktion katalysieren, sind unter anderem die eukaryotischen Proteinkinasen (ePKs). Sie zählen zu der Gruppe der Transferasen, die die Übertragung der γ -Phosphatgruppe eines Donorsubstrats, bevorzugt ATP, aber auch GTP, auf ein Akzeptorsubstrat katalysieren (s. Abb. 1). Hinsichtlich des Akzeptorsubstrats gibt es die Möglichkeit der Übertragung auf eine Hydroxylgruppe, d.h. eine O-Phosphorylierung, der Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin [9]. Es ist ebenso auch eine O-Phosphorylierung eines Aspartats möglich, diese führt jedoch zu einem instabilen Anhydrid. Seltener gibt es auch den Fall der N-Phosphorylierung der Amidgruppe von Histidin, Arginin oder S-Phosphorylierung des Cystein [10,11]. Durch den Transfer der Phosphatgruppe kommt es aufgrund deren polarer Ladung zu einer Ladungsveränderung des Akzeptorsubstrats. Eine solche Änderung der Ladung kann Konformationsänderungen hin zur aktiven oder inaktiven Konformation, eine Veränderung der Lokalisation innerhalb der Zelle oder eine Modifikation der Bindungseigenschaften zur Folge haben. Das Gegenstück zu den ePKs bilden die Proteinphosphatasen, welche die Rückreaktion, also die Dephosphorylierung von Substraten, katalysieren [12].

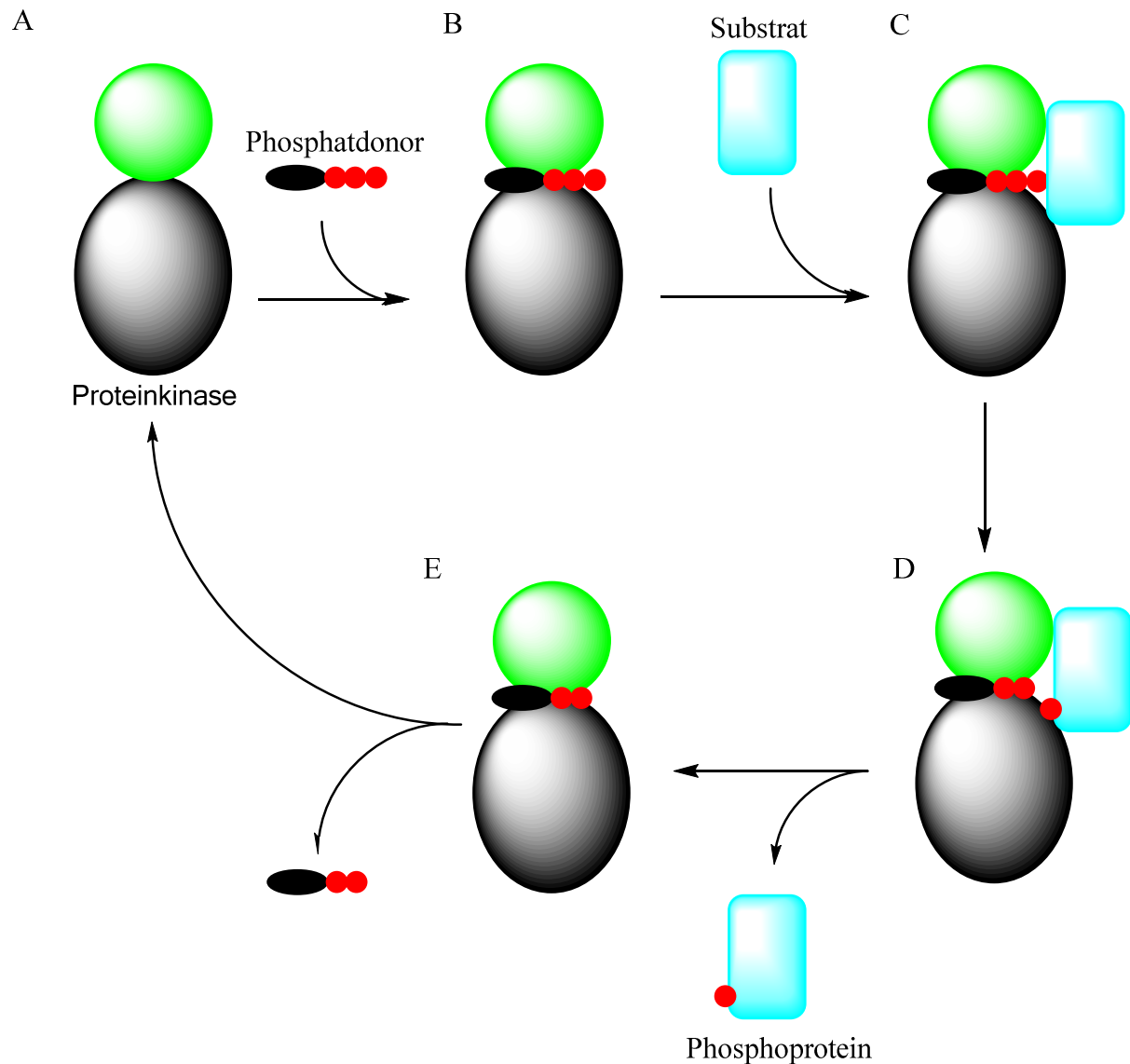


Abb. 1 Reaktionsverlauf der Proteinphosphorylierung:

Die Abbildung zeigt die verschiedenen Reaktionsschritte bei der Proteinphosphorylierung. Zunächst muss ein Phosphatdonor (ATP/GTP) an eine Kinase binden (A/B). Anschließend kommt es zur Substratbindung (C). Im nächsten Schritt erfolgt der Phosphattransfer (D). Dann wird zunächst das phosphorylierte Substrat wieder freigegeben (D/E) und zuletzt ADP/GDP (E/A). Die Proteinkinase steht nun für die nächste Reaktion zur Verfügung. (Abbildung angelehnt an Übersax und Ferrell 2007 [9])

Insgesamt wurden 518 Gene im humanen Genom nachgewiesen, welche für Proteinkinasen codieren, dies entspricht etwa 2 % des gesamten menschlichen Genoms. Dabei codieren 478 Gene für die Superfamilie der ePKs und 40 Gene für sogenannte atypische Proteinkinasen [13]. Im Prinzip gibt es zwei Superfamilien und die atypischen Proteinkinasen, welche einer eigenen Sequenzfamilie angehören. Die zwei Superfamilien sind die bereits erwähnten ePKs und die prokaryotischen Histidin-Kinasen. Insgesamt gesehen sind diese Termini irreführend, da beide Superfamilien in Eukaryoten, Prokaryoten und Archebakterien zu finden sind [13,14]. Die ePKs können in zwei weitere Gruppen aufgeteilt werden, je nachdem welche Aminosäuren für die Phosphorylierung bevorzugt werden. Zum einen gibt es

die Serin/Threonin-Kinasen, zu welchen auch die in dieser Arbeit behandelte Proteinkinase CK2 zählt, und zum anderen die Tyrosin-Kinasen [15]. Beide zusammen bilden das menschliche Kinom (in Anlehnung an das Genom) und sind verantwortlich für die Phosphorylierung von ca. 10000 Proteinen. Die größten Familien sind dabei in Abb. 2 zu sehen; hierzu zählen die AGC (Proteinkinasen A, G und C), CAMK (Calmodulin-abhängige Proteinkinase), CK1 (Caseinkinase 1), CMGC (CDK (Cyclin-abhängigen Kinasen); MAPK (Mitogen-aktivierte Protein Kinase); GSK3 (Glycogensynthasekinase 3) und CLK (CDC like Kinase)), STE (MAPK-Kaskade-Kinasen), TK (Tyrosinkinasen) und TKL (Tyrosinkinase-ähnliche Kinasen) [13,16].

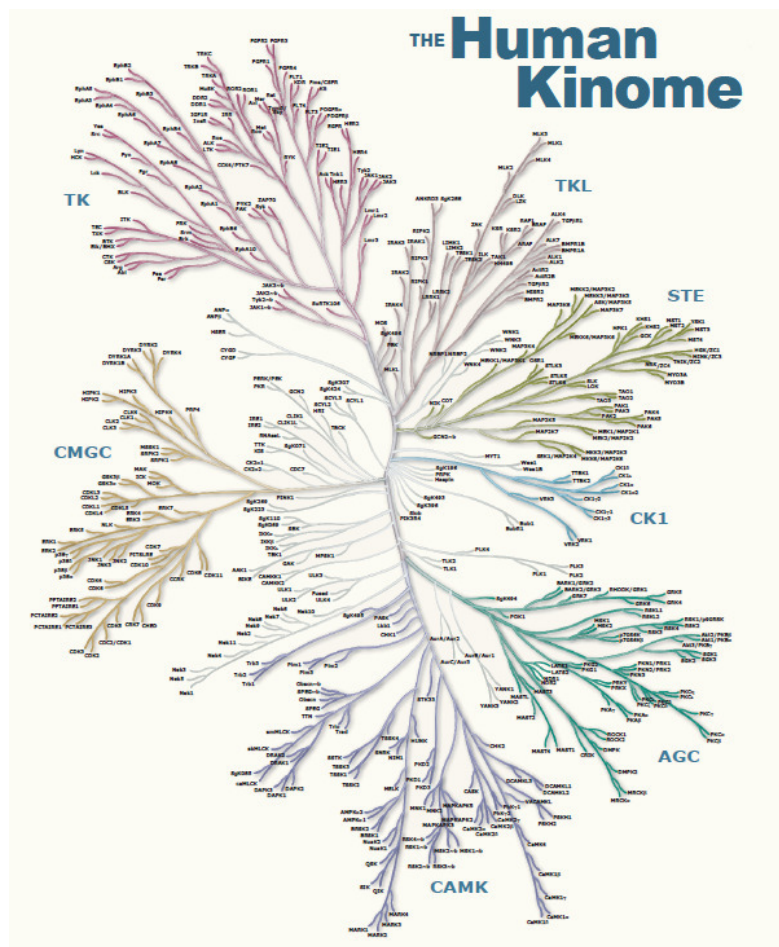


Abb. 2 Das humane Kinom:

Dendrogram der wichtigsten ePKs und ihren Familien. Reproduziert nach dem Poster zu Manning *et al.* [13] mit freundlicher Genehmigung durch die AAAS.

Die Phosphorylierung durch ePKs ist ein streng regulierter Prozess, bei dem eine Überphosphorylierung verhindert werden soll. Bezüglich der Regulation gibt es verschiedene vielschichtige Mechanismen für die verschiedenen Proteinkinasen. Hierzu zählt die Aktivierung durch sekundäre Botenstoffe, wie beispielsweise bei der CAMK, die in Abhängigkeit von der Calmodulinkonzentration innerhalb der Zelle aktiviert wird. Auch die cAMP-abhängige Proteinkinase (CAPK) wird durch sekundäre Botenstoffe, in diesem Fall durch das zyklische

AMP (cAMP) aktiviert [17]. Andere Proteinkinasen werden durch PPIs reguliert. Dazu zählt die Bindung eines anderen Proteins, wie bei den CDKs, was letztendlich zur Aktivierung der Kinase führt [18]. Die Dissoziation von Proteinuntereinheiten aus einem Komplex kann ebenfalls zur Aktivierung führen. Dies trifft u. a. auf die CAPK zu, welche in ihrer inaktiven Form ein heterotetramerer Komplex aus zwei β - und zwei α -Untereinheiten ist. Nach Bindung von cAMP an die β -Untereinheit der CAPK kommt es zur Dissoziation und so zur Aktivierung. Nach der Dissoziation liegt die α -Untereinheit als aktives Monomer vor [19]. Proteinkinasen werden auch selbst durch Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen reguliert. Beispiele für diese Art der Regulation sind zum einen die p38MAP-Kinase, welche durch Phosphorylierung an zwei Aminosäuren in ihre aktive Konformation übergeht [20]. Bei der GSK3 hingegen führt die Phosphorylierung durch die Proteinkinase B zur Inaktivierung; für die Aktivierung muss eine Dephosphorylierung erfolgen [21].

Ist die Regulation der ePKs nicht mehr gegeben aufgrund von Mutationen oder Deregulationen, so kann dies ernsthafte pathologische Folgen haben. Sie spielen dann eine Rolle in der Entstehung verschiedener Erkrankungen. Hierzu zählt im Besonderen die Entwicklung von Krebs. Solche Deregulationen wurden ebenfalls bei anderen Krankheitsbildern wie Diabetes, Neurodegeneration, chronischen Entzündungen, Infektionen oder viralen Erkrankungen beobachtet.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten innerhalb der Familie der ePKs wurde diese lange nicht als Zielstruktur für die Entwicklung von Arzneistoffen in Betracht gezogen, da eine selektive Hemmung als für sehr schwierig erachtet wurde und Arzneistoffe mit der hohen intrazellulären Konzentration an ATP (2-10 mM) konkurrieren müssten. [22] Genauer zur Inhibition von Proteinkinasen ist in Kapitel 1.3 beschrieben.

1.2.2 Struktureller Aufbau von eukaryotischen Proteinkinasen

Die meisten ePKs sind strukturell sehr ähnlich, sowohl global gesehen als auch in Bezug auf das aktive Zentrum. Die grundlegende Struktur besteht aus einer C-terminalen Domäne, welche hauptsächlich aus α -Helices aufgebaut ist, und einer N-terminalen Domäne, die überwiegend aus einem fünfsträngigen β -Faltblatt gebildet wird. Verbunden sind die beiden Domänen durch eine Gelenkregion, das aktive Zentrum der ePKs enthält und teilweise für die Bindung des Phosphatdonors verantwortlich ist. Das aktive Zentrum kann sich dabei in zwei Zustände befinden: zum einen der Grundzustand mit minimaler Aktivität und zum anderen dem Zustand maximaler Aktivität [23]. Aufgrund des gemeinsamen Katalysemechanismus ist der aktive Zustand der ePKs sehr ähnlich, was zu Selektionsproblemen führt (s. Kapitel 1.3). Im Grundzustand sind diese Ähnlichkeiten weniger stark ausgeprägt.

Kommt es zur Aktivierung einer Proteinkinase, so hat dies große strukturelle Veränderungen zur Folge. Dabei werden die Aktivierungsschleife und die Helix- α C, d. h. die einzige α -Helix innerhalb der N-terminalen Domäne, so in Stellung gebracht, dass die katalytisch aktiven Reste des aktiven Zentrums für die Katalyse zur Verfügung stehen [23]. Die Aktivierungsschleife ist in einer geöffneten Konformation, wodurch die Bindung von ATP/GTP möglich ist. Das γ -Phosphat wird abgespalten und die durch das Lösen der Bindung frei werdende Energie wird für die Übertragung der Phosphorylgruppe auf das im zweiten Schritt gebundene Akzeptorsubstrat verwendet. Nach der Phosphorylierung erfolgt die Freisetzung des Phosphoproteins (Produkt) und anschließend die des ADP/GDP-Moleküls [9].

Ein strukturell wichtiges Element für die Katalyse ist eine kurze Aminosäuresequenz aus Aspartat, Phenylalanin und Glycin (DFG-Motiv), welche sich am Anfang der Aktivierungsschleife befindet und bei der Aktivierung in das aktive Zentrum gedreht wird. Dies gibt der Konformation die Bezeichnung „DFG-in“. Das DFG-Motiv ist für die Koordination eines Mg^{2+} -Ions verantwortlich, welches für die Abschirmung des zu übertragenden Phosphatrestes benötigt wird. Ein zweites Schlüsselement für die Katalyse ist die in der N-terminalen Domäne liegende Helix- α C. Sie bildet im aktiven Zustand eine über einen Glutamatrest vermittelte Salzbrücke mit einem Lysinrest der Gelenkregion aus. Durch diese Salzbrücke ist das Lysin so fixiert, dass es die α - und β -Phosphatgruppe des ATP ausrichten kann. Beim Übergang zum inaktiven Zustand wird diese Salzbrücke aufgebrochen und die Helix- α C aus dem aktiven Zentrum rotiert. Dies hat ebenfalls eine Rotation des DFG-Motivs in den sogenannten „DFG-out“- Zustand zur Folge [23,24]. Hierbei richtet sich das Phenylalanin des DFG-Motivs aus dem N-Terminus der Aktivierungsschleife in Richtung der ATP-Bindungsstelle aus (s. Abb. 3) und bewegt sich dabei um 10 Å im Vergleich zu seiner Position in der aktiven Form [25,26]. Die beiden Zustände des DFG-Motivs stellen Angriffspunkte verschiedener Inhibitoren dar (s. Kapitel 1.3).

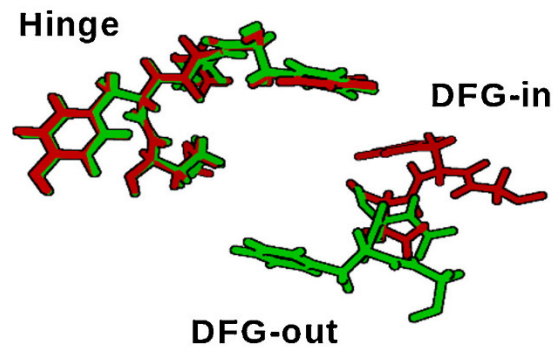


Abb. 3 Nahansicht der Hauptunterschiede zwischen DFG-in und DFG-out Konformation.

Darstellung des DFG-Motivs in einer aktiven (DFG-in) und einer inaktiven (DFG-out) Proteinkinase. Abbildung abgewandelt nach *Podlipnik et al.* [26]. Mit freundlicher Genehmigung durch Elsevier.

Eine weitere wichtige Theorie bei der Aktivierung der Proteinkinasen ist die Spine-Theorie. Dabei wird zwischen dem regulatorischen R-Spine und dem katalytischen C-Spine unterschieden, welche beide aus Stapeln hochkonservierter hydrophober Aminosäuren bestehen. Der R-Spine schließt das Phenylalanin des DFG-Motivs ein und verbindet den C- und N-Terminus der Proteinkinase [27]. In der inaktiven Form der Proteinkinase befindet sich dieser Spine in Unordnung und die Aktivierungsschleife in ihrer geschlossenen Form. Bildet sich der Spine hingegen aus, so werden auch die für die Katalyse benötigten Aminosäuren in ihre aktive Ausrichtung gebracht. Der R-Spine ist dabei insgesamt für die Regulation der Ausrichtung in die aktive Form verantwortlich [27]. Der katalytische C-Spine erstreckt sich von der C-terminalen bis zur N-terminalen Domäne. Durch Bindung des ATP-Moleküls kommt es zur Schließung einer Lücke innerhalb des C-Spines, wodurch die letzte notwendige Konformationsänderung für den aktiven Zustand erfolgt. Eine vollständige Aktivierung der Proteinkinase und damit die Übertragung der Phosphorylgruppe auf ein Akzeptorsubstrat bedarf immer der Ausrichtung des R-Spines gefolgt von der Schließung des C-Spines [28].

1.3 Proteinkinase-Inhibitoren

Aufgrund der großen Rolle, die Proteinkinasen in vielen zellulären Prozessen spielen, stellt eine fehlerhafte Regulierung ein enormes Problem dar. Daher werden Proteinkinasen neben den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) mittlerweile als eine der wichtigsten medizinischen Zielstrukturen für die Entwicklung von Arzneistoffen angesehen [22,29]. Zu diesem Zweck wurde ein Pharmakophor-Modell von Traxler und Furet auf der Grundlage der ATP-Bindungstasche entwickelt (s. Abb. 4) [30]. Das Hauptmotiv ist hierbei die als „hinge“ bezeichnete Gelenkregion zwischen C- und N-Terminus der Proteinkinase. Die Gelenkregion bildet in beide Richtungen, am Übergang zu C- und N-Terminus, jeweils eine hydrophobe Region aus, welche die Adenin-bindende Region umgeben.

Weiterhin gibt es für die strukturelle Entwicklung von Inhibitoren noch jene Regionen, die die Ribose und die Phosphatgruppen binden und Ansatzpunkte für die Optimierung von Leitstrukturen bieten.

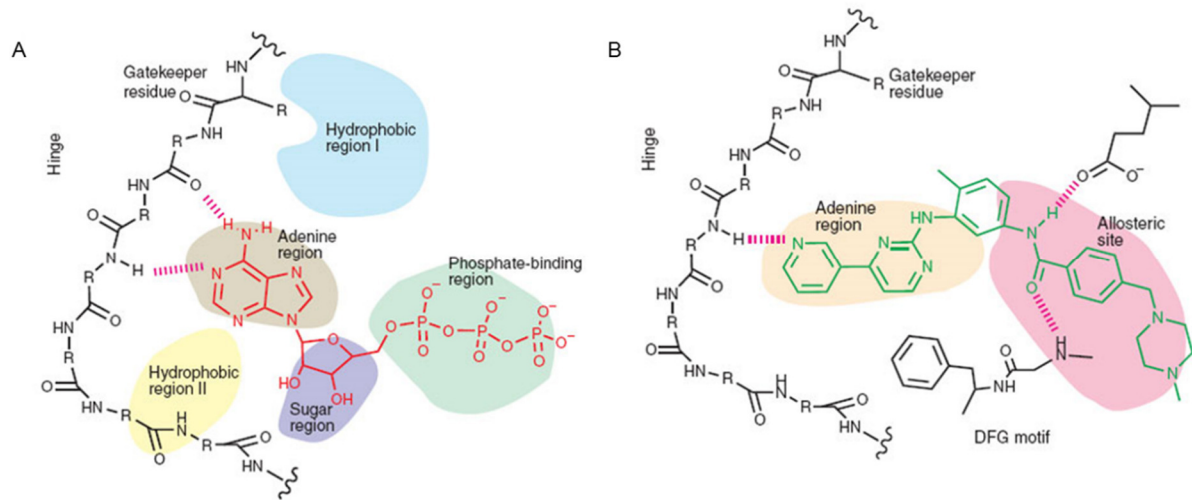


Abb. 4 Pharmakophor-Modell für Proteinkinase-Inhibitoren:

Schematische Abbildung der ATP-Bindungsstelle eines aktiven Zentrums einer ePK. Pharmakophormodell nach *Furet und Traxler* [30] und erweitert durch *Liu und Gray* [31]. B: Erweiterung des Modells um die allosterische Bindungstasche. Abbildung entnommen aus *Liu und Gray*, mit freundlicher Genehmigung durch die Nature Publishing Group.

Bei Proteinkinasen werden im Allgemeinen drei Klassen von Inhibitoren unterschieden. Klasse I Inhibitoren wirken ATP-kompetitiv und binden an die aktive Form der Proteinkinase. Sie werden teilweise auch als DFG-in-Inhibitoren bezeichnet, da das DFG-Motiv in der aktiven Form in das aktive Zentrum gedreht ist. Bei dieser Klasse der Inhibitoren stellt die Selektivität das größte Hindernis dar, da die ATP-Bindungstasche aller Proteinkinasen eine hohe strukturelle Homologie aufweist und in ihrer aktiven Form stark konserviert ist [30,32]. Fehlende Selektivität kann zu unerwünschten Nebenwirkungen beitragen. ATP-kompetitive Inhibitoren bilden bei der Bindung ein Netzwerk hydrophober Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen mit der ATP-Bindungsstelle aus. Neben dem Selektivitätsproblem kommt noch hinzu, dass diese Inhibitoren mit der hohen Konzentration an intrazellulärem ATP konkurrieren müssen. Diese ist meist weitaus höher als die Michaelis-Konstante K_M der meisten Proteinkinasen für ATP [22][33].

Die Klasse II-Inhibitoren binden ebenfalls an die ATP-Bindungsstelle, allerdings an jene der inaktiven Form des Enzyms. Sie werden daher auch als DFG-out-Inhibitoren bezeichnet, da das DFG-Motiv in der inaktiven Form aus dem aktiven Zentrum heraus gedreht ist, wodurch eine weitere hydrophobe Bindungstasche gebildet wird (s. Abb. 4 B) [31,34]. Vorteil dieser Inhibitorklasse ist, dass die inaktive Form der Proteinkinasen eine geringe strukturelle Homologie aufweist. Dies begünstigt die Entwicklung selektiver Proteinkinaseinhibitoren. Ein

Beispiel für einen bereits zugelassenen Inhibitor der Klasse II ist Imatinib (Gleevec®, s. Abb. 4 B) der Firma Novartis. Imatinib bindet an die inaktive Form der Bcr-Abl Kinase (Breakpoint Cluster Region- Abelson murine leukemia Kinase und wird erfolgreich gegen chronisch myeloische Leukämie (CML) angewendet [31].

Klasse III-Inhibitoren binden nicht an das aktive Zentrum, sondern an eine allosterische Bindungsstelle. Auch dieser Inhibitionsansatz erleichtert es, die Selektivität von Inhibitoren zu erhöhen, da die Aminosäuresequenz außerhalb der ATP-Bindungstasche wenig konserviert ist [33].

Neben der Selektivität eines Inhibitors stehen auch seine Bindungseigenschaften im Fokus. Soll die Verbindung als Arzneistoff eingesetzt werden, spielen zudem die Absorption und Verteilung des Wirkstoffes eine große Rolle. Für eine bessere Beurteilung von Wirkstoffen entwickelte Lipinski die nach ihm benannten Lipinski's „Rule of five“ [35,36].

1. Das Molekulargewicht eines Inhibitors sollte ≤ 500 Da sein.
2. Für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen sollten nicht mehr als 5 Donoren vorhanden sein.
3. Ebenso sollten nicht mehr als 10 Wasserstoffbrücken-Akzeptoren vorliegen.
4. Die Verbindung sollte relativ lipophil sein und einen LogP (Verteilungskoeffizient) < 5 aufweisen.
5. Substrate bzw. Substratderivate von biologischen Transportern bilden dabei eine Ausnahme von den Regeln 1-4.

Die Lipinski's „Rule of five“ sind als Anhaltspunkte bei der Entwicklung von Arzneistoffen zu verstehen und müssen nicht zu 100 % eingehalten werden. Dies lässt sich daran festmachen, dass ca. 1/7 aller durch die amerikanische Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittellizenzbehörde (FDA) zugelassenen Arzneistoffe besagten Regeln nicht entsprechen [37].

1.4 Die Proteinkinase CK2

Im Jahr 1954 entdeckten George Burnett und Eugene Kennedy die Proteinkinase CK2, welche sie Protein-Phosphokinase nannten [38]. Der Begriff Caseinkinase 2 bzw. CK2 wurde ab den späten 1970er Jahren geprägt. [39] CK2 zählt zur Familie der CMGC-Kinasen, welche auch die Cyclin-abhängigen Kinasen, die MAP-Kinasen und die Glycogensynthasekinase 3 beinhaltet (s. Abb. 5) [13].

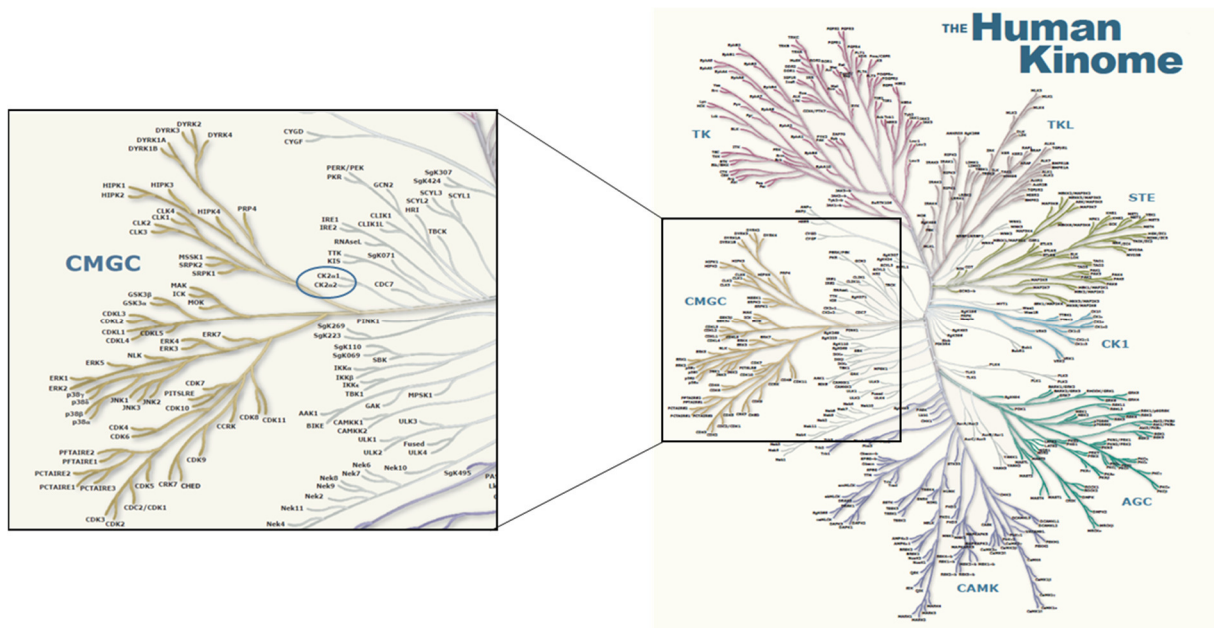


Abb. 5 Die CMGC-Familie:

Dendrogramm der CMGC-Familie und die Lage von CK2 α und CK2 α' innerhalb dieser Familie. Abbildung verändert nach Manning *et al.* 2002 und dem zugehörigen Poster [13]. Mit freundlicher Genehmigung der AAAS.

CK2 ist eine hochkonservierte Serin/Threonin-Kinase, welche ubiquitär exprimiert wird. Sie konnte in allen Zelltypen von Eukaryoten, sowie im Nucleus als auch im Cytosol dieser Zellen nachgewiesen werden [40,41]. Dabei ist sie eine pleiotrope Proteinkinase mit mittlerweile mehr als 300 bekannten Substraten [42,43].

Aufgrund dieser Pleiotropie ist bis heute noch keine genaue Einordnung der CK2 in die bisher bekannten Signaltransduktionsnetzwerke erfolgt. Es ist jedoch nachgewiesen, dass Proteinkinase CK2 aufgrund ihrer ubiquitären Expression und ihrer Pleiotropie in zahlreiche fundamentale zelluläre Prozesse involviert ist [44]. Hierzu zählen die Regulierung des Zellzykluses [45], des zirkadianen Rhythmus [46], der Genexpression [42], des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung [40,44], der Embryogenese [47] sowie der Apoptose (wobei CK2 anti-apoptotisch wirkt) [40,44]. Weiterhin wurde der CK2 eine Rolle bei der Weiterleitung von Signalen, welche der Zelle beim Überleben bzw. dem Schutz gegen Stress helfen, zugesprochen [48][49].

Das CK2-Holoenzym besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten, der CK2 α und/oder der CK2 α' , welche an ein Dimer aus regulatorischen Untereinheiten (CK2 β) binden [50–53]. Sowohl CK2 α /CK2 α' als auch das CK2-Holoenzym sind konstitutiv aktiv und unterliegen keinerlei Regulationsmechanismen, wie z. B. der Aktivierung durch Second Messenger, der Phosphorylierung durch andere Proteinkinasen oder der Autophosphorylierung. Dieser Punkt unterscheidet CK2 von den restlichen Mitgliedern der CMGC-Familie [54, 55].

Für die Phosphorylierung von Akzeptorsubstraten nutzt CK2 ATP und GTP als Phosphorylgruppendonator, was zu einer dualen Co-Substratspezifität führt. Dies macht CK2 zu einer Besonderheit, da sie die einzige bekannte Serin/Threonin-Kinase ist, für welche gezeigt wurde, dass ATP gegenüber GTP nur minimal bevorzugt wird [56,57]. Als Akzeptorsubstrate dienen saure Peptide/Proteine mit einer relativ kurzen Konsensussequenz (s. Abb. 6) [58].

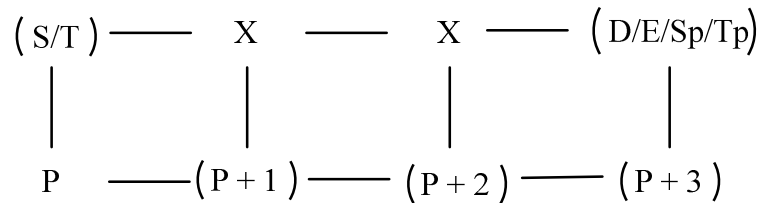


Abb. 6 Substraterkennungsmotiv:

Die minimale Konsensussequenz der CK2: in Position 3 zur Phosphorylierungsposition befindet sich meist ein saurer, negativ geladener Aminosäurerest. Ein negativ geladener Aminosäurerest in Position 1 zur Phosphorylierungsposition kann die Substratbindung fördern oder das Fehlen eines sauren Restes in Position 3 ausgleichen.

CK2 wird mit verschiedenen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht (siehe vorn), wobei bis heute keine Mutationen bekannt sind, welche die konstitutive Aktivität und ihre Beteiligung an den Erkrankungen erklären würden [40][59]. Der Hauptfokus liegt hierbei auf der Überexpression der Proteinkinase in einer Vielzahl an Tumoren, z. B. bei der akuten lymphoblastischen Leukämie. Diese Überexpression führt zu einer gesteigerten Proliferation der Tumorzellen, wohingegen eine Inhibition der CK2 zur Apoptose und somit zur Verkleinerung von Tumoren führt [60,61]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von CK2 in Tumoren die Multi-Drug-Resistenz dieser Tumore stärkt [62]. Zu den soliden Tumoren, in welchen CK2 besonders überexprimiert wird, zählen kolorektale Karzinome [63,64] sowie Brust- [65–67] und Prostatakarzinome [68–71]. Weiterhin steht CK2 im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer und Parkinson, entzündlichen und vaskulären Erkrankungen, sowie Erkrankungen der Skelettmuskulatur und des Knochengewebes. Zudem gibt es auch Zusammenhänge bei viralen und parasitären Krankheiten [72].

1.4.1 Strukturelle Aspekte der CK2

Die erste Röntgenkristallstruktur des CK2-Holoenzym wurde 2001 veröffentlicht und zeigt den schmetterlingsartigen Aufbau des heterotetrameren Komplexes (s. Abb. 7) [51]. Beide CK2 β -Untereinheiten sind an der Bindung der zwei CK2 α (α')-Untereinheiten beteiligt, wobei die Interaktionsfläche $\sim 1000 \text{ \AA}^2$ beträgt [51,73]. Die zwei CK2 α (α')-Untereinheiten haben keinen direkten Kontakt miteinander [74]. Die Interaktion der CK2 α -Untereinheit mit dem CK2 β -Dimer findet über Interaktionen der β -Faltblattstränge 1-3 von CK2 α mit Seitenketten der CK2 β -Untereinheit statt. Beide CK2 α -Untereinheiten interagieren dabei mit beiden CK2 β -

Untereinheiten. Zum einen wird die Interaktion mit einer CK2 α -Untereinheit über die C-Termini vermittelt. Zum anderen gibt es auch eine Interaktion mit der jeweils anderen CK2 β -Untereinheit über deren zentralen Bereich mit der anderen CK2 α -Untereinheit. Die β 4/ β 5-Schleife der CK2 α spielt ebenfalls eine besondere Rolle bei der Formierung des CK2-Holoenzym. Diese Kontaktstelle zeigt eine geschlossene Konformation, wenn die CK2 α als Monomer vorliegt, und verhindert sterisch eine Bindung an CK2 β . Im Holoenzym liegt diese Schleife hingegen in einer geöffneten Konformation vor, wie sie bisher auch in allen CK2-Holoenzym-Kristallstrukturen gezeigt werden konnte [75].

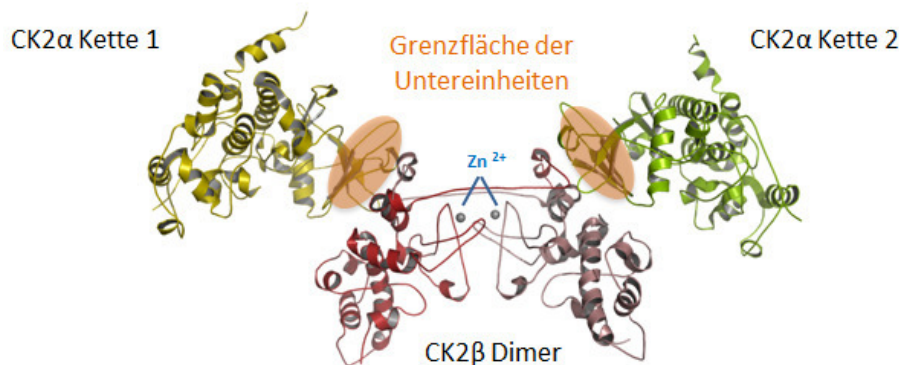


Abb. 7 Kristallstruktur des CK2-Holoenzym:

Das CK2-Holoenzym (PDB: 1JWH) bildet sich aus einem Dimer von regulatorischen CK2 β -Untereinheiten, an das zwei katalytische CK2 α -Untereinheiten binden. Die für diese Arbeit wichtige Grenzfläche der Untereinheiten ist farblich (hellbraun) hervorgehoben. Abgewandelt nach *Niefind et al.* [51] Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.

Die katalytische CK2 α -Untereinheit weist den prinzipiellen Aufbau aller ePKs auf. Sie hat eine N-terminale Domäne, welche hauptsächlich aus einem fünfsträngigen antiparallelen β -Faltblatt besteht und einer markanten α -Helix besteht. Diese ist über eine Gelenkregion mit der C-terminalen Domäne, welche sich vornehmlich aus α -Helices und zwei kleineren zweisträngigen β -Faltblättern zusammensetzt, verbunden. CK2 α zeigt die typische Insertion der Helices α H, α I und α J, welche auch in anderen Mitgliedern der Superfamilie der CMGC-Kinasen zu finden ist [55]. Die CK2 α -Untereinheit weist jedoch auch einige strukturelle Besonderheiten gegenüber anderen Mitgliedern der Superfamilie der CMGC-Kinasen auf. Dies betrifft insbesondere die Aktivierungsschleife, welche durch den N-Terminus in einer aktiven Konformation fixiert bzw. stabilisiert wird. Hierdurch ist CK2 α konstitutiv aktiv [76]. Sie besitzt zwar Phosphorylierungsstellen innerhalb der Aktivierungsschleife, aber diese sind für die Aktivität nicht obligatorisch und ebenso fraglich. Dies wurde 1998 mit Hilfe der ersten Kristallstruktur der CK2 α aus *Zea mays* (im Komplex mit ATP) gezeigt [77]. Zudem wurde bewiesen, dass die CK2 α -Untereinheit im Gegensatz zu anderen ePKs ein DWG-Motiv anstelle des DFG-Motivs besitzt. Durch den Austausch des Phenylalanins gegen ein

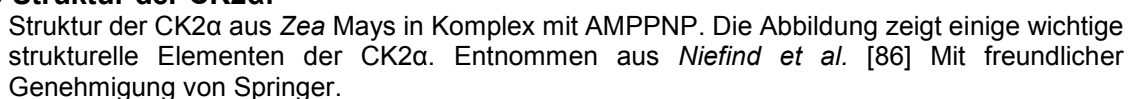
Tryptophan kann die CK2 α nicht wie andere ePKs eine DFG-out-Konformation einnehmen. Der Tryptophanrest ist dabei für die Stabilisierung der Aktivierungsschleife in der aktiven Konformation durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke verantwortlich [76].

Der dualen Cosubstratspezifität von CK2 α liegen ebenfalls verschiedene strukturelle Elemente zugrunde. So zeigt die CK2 α -Untereinheit eine besondere Flexibilität der Gelenkregion, welche in einer offenen und einer geschlossenen Konformation vorliegen kann. Die offene Konformation wurde erstmals 1999 in einer Kristallstruktur der CK2 α aus *Zea mays* im Komplex mit GMPPNP nachgewiesen und stellt eine Besonderheit der CK2 α dar. In der geöffneten Form kommt es zu einer Positionsveränderung des Phenylalanins 121, welches im Vergleich zur geschlossenen Konformation der Gelenkregion genau in die entgegengesetzte Richtung zeigt. Durch die Veränderung der Position vergrößert sich das Raumangebot, welches die Bindung des GTP erlaubt. In der geschlossenen Konformation besteht hierzu keine Möglichkeit, da GTP an der Bindung sterisch gehindert wird [56].

Eine weitere strukturelle Besonderheit des CK2-Holoenzym besteht in der Ausbildung von Filamenten durch Oligomerisierung in Abhängigkeit von der Salzkonzentration [78]. Die Rolle dieser Filamente *in vivo* ist bis heute noch nicht geklärt. Wenn zwei oder mehr CK2-Holoenzyme in einer Juxtaposition aufeinandertreffen, dann passen sie genau ineinander. Es kommt zur Interaktion der N-terminalen Phosphorylgruppenakzeptor-Bindungsstelle auf der CK β -Untereinheit mit der katalytischen Region der CK2 α -Untereinheit eines benachbarten Moleküls [79]. Dabei spielen elektrostatische Wechselwirkungen eine große Rolle, was wiederum die Abhängigkeit der Oligomerisierung von der Salzkonzentration erklärt. Bei der Oligomerisierung werden sowohl ringförmige als auch filamentöse Aggregate in unterschiedlichen Größen postuliert (s. Abb. 8), wobei ringförmige Oligomere eine deutlich höhere katalytische Aktivität aufweisen. Insgesamt wird den Filamenten und Oligomeren eine regulatorische Rolle zugesprochen [80–82].

Abb. 8 Strukturen der verschiedenen postulierten CK2 Oligomere:
Nachdem Glover 1986 entdeckt hatte, dass CK2 *in vitro* Filamente ausbildet, konnten Valero et al. dies 1995 ebenfalls nachweisen. Valero et al. postulierten insgesamt 4 verschiedenen Strukturen: das Protomer, ringartige Strukturen sowie dicke und dünne Filamente. Abbildung angelehnt an Valero et al. [81]. Mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

Die zwei Untereinheiten CK2 α und CK2 α' sind paraloge Enzyme, welche auf unterschiedlichen Chromosomen codiert werden [83,84]. Paraloge Proteine entstehen, wenn es zu einer Genverdopplung kommt und die homologen Gene anschließend im Genom durch Inversion, Translokation und Transposition verteilt werden. Eines der beiden Paralogen kann nun durch Mutation die bisherige Funktion in einer spezialisierten und leicht veränderten Form ausführen. Kommt es nicht zu einer spezialisierten Funktion bzw. hat das paraloge Protein für den Organismus keinen Nutzen, so kommt es zur Ausbildung von Pseudogenen, welche keine Funktion mehr ausweisen [85].



CK2 α und CK2 α' sind sich sowohl in ihrer Primärsequenz als auch in ihrer Struktur sehr ähnlich.[87]. Die Struktur der CK2 α ist in Abb. 9 zu sehen. Die Homologie zwischen den ersten 330 Aminosäuren beträgt dabei 85 %. Betrachtet man den C-Terminus beider Proteine, so lassen sich hier die größten Unterschiede finden. CK2 α hat einen um 41 Aminosäuren längeren C-Terminus als CK2 α' [83]. Hieraus ergeben sich für CK2 α' vier Phosphorylierungs- und eine Glykolisierungsstelle weniger, was wiederum Unterschiede in der Interaktion mit einigen Substraten zur Folge hat [88,89]. Die genaue Rolle des C-Terminus der CK2 α ist bis heute jedoch noch unklar. Insgesamt ist die Rolle von CK2 α' weniger erforscht als die der paralogen CK2 α . Wahrscheinlich wird CK2 α' hauptsächlich im Gehirn und in den Testikeln exprimiert und nicht ubiquitär wie CK2 α [90]. Der Knockout von CK2 α in Mäusen ist aufgrund ihrer Bedeutung in der Embryogenese letal; bei *Saccharomyces cerevisiae* führt er ebenfalls zum Absterben der Zellen [47,91]. Ein Knockout von CK2 α' in Mäusen ist hingegen nicht letal, sondern wird anscheinend durch eine gesteigerte CK2 α -Expression ausgeglichen. Lediglich die männlichen Tiere leiden unter Infertilität aufgrund einer unvollständigen Spermatogenese [92].

Strukturell ergeben sich ebenfalls kleinere Unterschiede zwischen den beiden Isoenzymen. CK2 α' bindet um etwa den Faktor 10 schwächer an die regulatorische Untereinheit CK2 β ; die CK2 β -vermittelte Thermostabilität, die für CK2 α beobachtet wurde, konnte für CK2 α' nicht nachgewiesen werden [93]. Die schwächere Bindung von CK2 α' an CK2 β wird auch in dieser Arbeit gezeigt und diskutiert. Durch kleinere Unterschiede in der ATP-Bindungstasche binden zudem die für CK2 α entwickelten ATP-kompetitiven Inhibitoren nicht mit der gleichen Affinität an CK2 α' [87,94]. Das CK2-Holoenzym kann neben der $\alpha\beta\beta$ -Form in einer $\alpha\alpha'\beta\beta$ - sowie $\alpha'\alpha'\beta\beta$ -Form vorliegen. Bei letzterer Form ist dabei die Möglichkeit der Autophosphorylierung nicht gegeben. Auch zeigen die Holoenzyme, die CK2 α' enthalten, nicht dasselbe Aggregationsverhalten bei niedrigen Salzkonzentrationen wie das $\alpha\beta\beta$ -Holoenzym [93].

1.4.3 Die CK2 β -Untereinheit

Bei der CK2 β -Untereinheit der CK2 handelt es sich strukturell gesehen um ein besonderes Protein. Derzeit gibt es bis auf das Stellat-Protein aus *Drosophila melanogaster* [95] keine weiteren Proteine, welche eine höhere Sequenzähnlichkeit aufweisen. Dagegen sind Proteine mit einer ähnlichen Sekundärstruktur bereits bekannt [50]. Die Struktur der CK2 β ist in Abb. 10 zu sehen. Die CK2 β -Untereinheit liegt aufgrund der hohen Effektivität der Dimerisierungsfläche permanent als Dimer vor [50]. Die Dimerisierung erfolgt durch ein Zinkfingermotiv, durch die Interaktion hydrophober Reste und die Überkreuzung der C-Termini. Das Zinkfingermotiv ist dabei atypisch. Es wird durch dreisträngige β -Faltblätter (β_1 , β_2 , β_3) gebildet, welche ein Zn^{2+} -Ion in einer tetraedrischen Geometrie koordinieren. Dabei fehlt aber bei CK2 β die sonst übliche Helix innerhalb des Zinkfingermotivs [50]. Eine ähnliche

Anordnung findet sich beim Transkriptionselongationsfaktor (TFIIS) und der RNA-Polymeraseuntereinheit 9 (RPB9) [72].

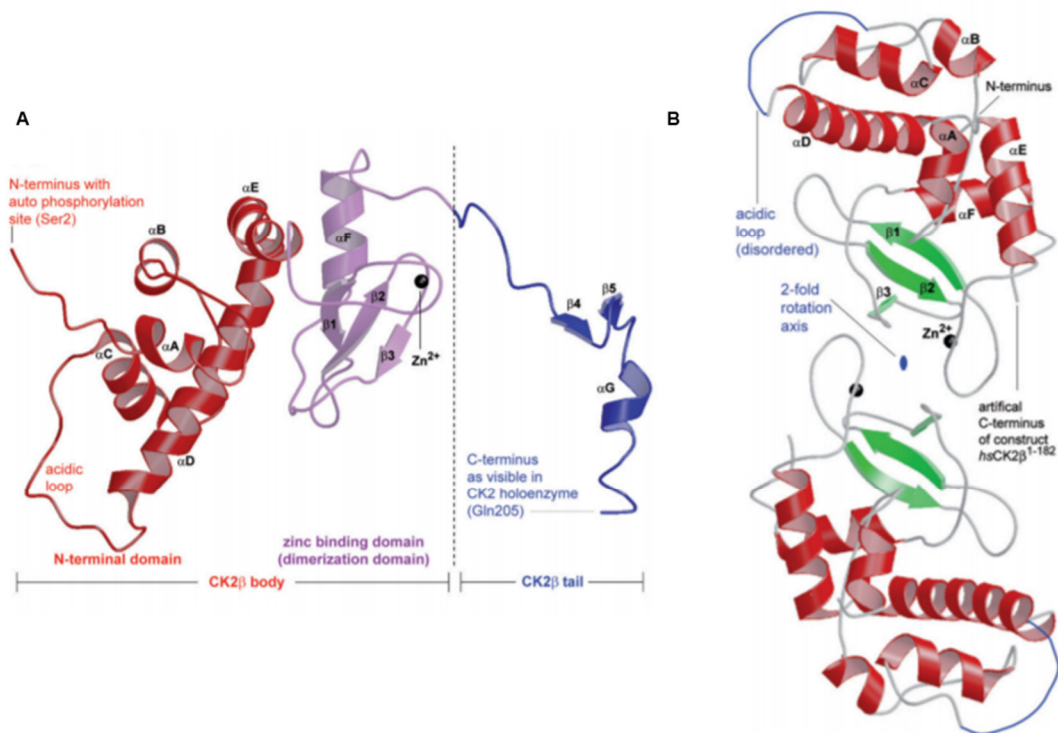


Abb. 10 Struktur CK2β:

Die Abbildung zeigt zum einen die Struktur der CK2β aus der Kristallstruktur des CK2-Holoenzym extrahiert (A). Zum anderen wird hier die Struktur des Dimers der *hsCK2β* gezeigt (B). *hs* steht für *Homo Sapiens*. Die Abbildung wurde von *Niefind et al.* abgewandelt [86]. Mit freundlicher Genehmigung von Springer.

Die CK2β stellt keinen Schalter für die Kinaseaktivität der CK2α dar; letztere ist auch ohne die Bindung an CK2β konstitutiv aktiv. Die Bindung an CK2β hat jedoch einen Einfluss auf die Stimulation der Kinaseaktivität [96,97]. Weiterhin führt die CK2α/CK2β-Interaktion zu einer Steigerung der Thermostabilität des Holoenzym und hat einen Einfluss auf das Substratprofil des Enzyms [98]. Es gibt Substrate, welche lediglich von CK2α-Monomeren, nicht aber vom Holoenzym phosphoryliert werden, wie Calmodulin [99]. Auf andere Protein hat CK2β einen hemmenden Einfluss bei der Bindung, hierzu zählt c-Mos [100]. Bei weiteren wie A-Raf [101] oder Chk1 [102] sorgt sie für eine gesteigerte Aktivität. Es wurde mittlerweile gezeigt, dass CK2β mit vielen Proteinen in Abwesenheit von CK2α interagiert. Bei einem Screening auf PPIs mit einem Yeast-Two-Hybrid-System (Y2H) wurden 40 Proteine gefunden, die an CK2β binden. Hierzu zählen z. B. die bereits erwähnten Kinasen c-Mos, A-Raf und Chk1, aber auch Proteinkinase C ζ (PKC ζ). Nicht nur diese Interaktionen lassen vermuten, dass CK2β eine CK2α-unabhängige Rolle in Zellen hat. Auch die Tatsache, dass CK2β Knock-out Mäuse letal sind, weist darauf hin, dass es eine eigene Rolle neben dem CK2 Holoenzym Komplex haben muss [103].

Die CK2 β -Untereinheit tritt mit Ausnahme einiger einzelliger Protozoen in allen Eukaryoten auf und hat dabei ein Molekulargewicht von 26-42 kDa.

Saccharomyces cerevisiae exprimiert insgesamt zwei CK2 β -Proteine, in *Arabidopsis thaliana* finden sich gar drei Homologe. Alle höheren Tiere exprimieren dagegen lediglich ein CK2 β -Protein. Dessen Primärsequenz zeigt eine Verteilung von basischen und sauren Resten innerhalb der C- und N-terminalen Domänen. Beiden Termini kommen dabei bestimmte Aufgaben zu, welche durch strukturbiochemische Methoden aufgeklärt werden konnten. Eine saure Region innerhalb des N-Terminus ist für die negative Regulation der CK2 zuständig [104,105]. Diese Region kann teilweise durch die Bindung polybasischer Peptide (z. B. Histon H4) oder Polyamine entfernt werden. Weiterhin ist im N-Terminus eine Autophosphorylierungsstelle mit der Sequenz MSSSEE enthalten, wobei der zweite Serinrest die präferierte Stelle für eine Phosphorylierung darstellt [104]. Der C-Terminus der CK2 β ist verantwortlich für die Interaktion mit CK2 α und ist an deren Regulation beteiligt. Die Dimerisierung der CK2 β erfolgt über das Zink-bindende Motiv und schützt das Protein vor Proteolyse und Denaturierung [106].

1.5 CK2-Inhibitoren

In diesem Kapitel sollen verschiedene Angriffspunkte für mögliche Inhibitoren der CK2 besprochen werden (s. Abb. 11). Dabei gibt es Moleküle, welche jeweils an einer der beiden Untereinheiten oder am Holoenzym binden [107].

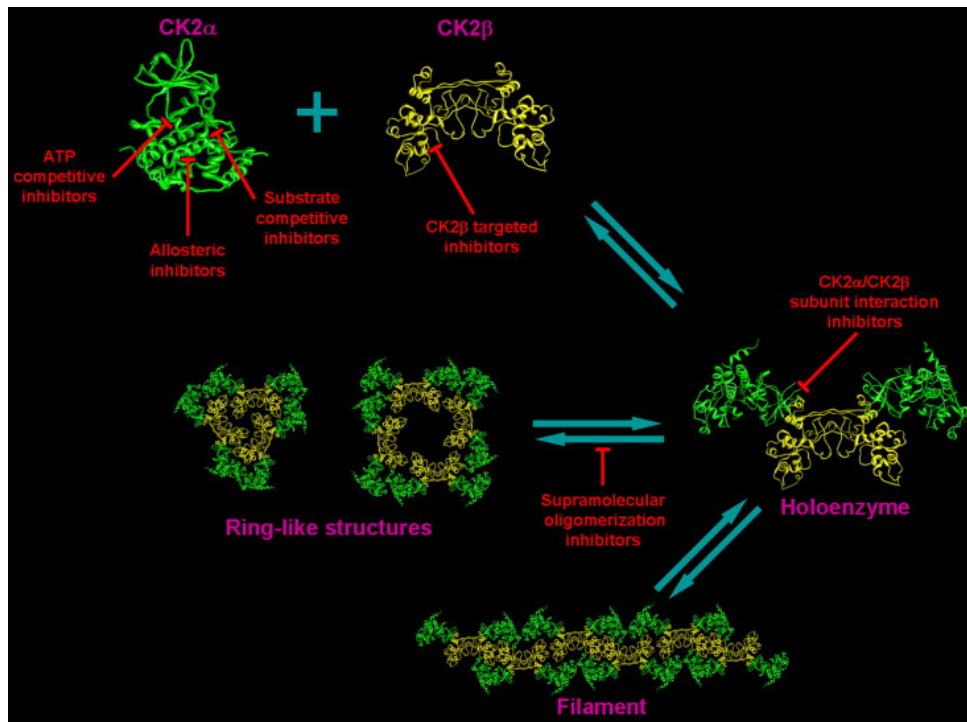


Abb. 11 Schematische Darstellung verschiedener Angriffspunkte von CK2-Inhibitoren:

Sowohl die katalytische als auch die regulatorische Untereinheit der CK2 bieten Interaktionspunkte für die Inhibition durch kleine Moleküle. Ebenso ist die Störung der Wechselwirkung der beiden Untereinheiten als möglicher Inhibitionsansatz anzusehen. Die Hemmung der Oligomerisierung zu ringartigen Strukturen, die eine gesteigerte katalytische Aktivität aufweisen, ist ein weiteres Prinzip für die Entwicklung von Inhibitoren. Entnommen aus *Prudent und Cochet* 2009 [107], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

1.5.1 ATP-kompetitive Inhibitoren

Die ATP-kompetitive Hemmung stellt bei Proteinkinasen das hauptsächliche Wirkprinzip niedermolekularer Inhibitoren dar. Aufgrund der großen Homologie der ATP-Bindungs tasche verschiedener Proteinkinasen ist die Selektivität der Inhibitoren hierbei das größte Problem. Dies trifft ebenso auf ATP-kompetitive Inhibitoren der CK2 zu, einige Beispiele sind Abb. 12 zu sehen. Der erste auf diese Weise wirkende CK2-Inhibitor, das 5,6-Dichlor-1 β -D-ribosylbenzimidazol (DRB), wurde 1986 beschrieben (s. Abb. 12) [108]. Ausgehend von DRB wurden bis heute weitere potente Verbindungen, wie das 4,5,6,7-Tetrabrombenzimidazol (TBB) [109] oder das 4,5,6,7-Tetraiodbenzimidazol (TIBI) [110], entwickelt. Zu den ATP-kompetitiven Hemmstoffen der CK2 zählen verschiedene Naturstoffe wie Apigenin [111], Emodin [112], Hematein [113] und Ellagsäure [114]. Ausgehend von Apigenin wurden weitere synthetische Flavonderivate als potente Inhibitoren identifiziert. In den meisten Fällen handelt

es sich dabei um halogenierte Derivate. Ein Beispiel für einen solchen Inhibitor ist FLC26. Dieser wurde mit Hilfe der Kombination aus kombinatorischer organischer Chemie, molekularen Modeling Techniken und biochemischen Tests entwickelt. Grundlage für die Entwicklung waren die Strukturwirkungsbeziehungen einer Bibliothek von 3-Hydroxy-4'-Carboxyflavonen [115].

Eine weitere wichtige Verbindungsklasse stellen kondensierte polyphenolische Derivate auf Basis des Indol-Chinozolin dar [116]. Die bekannteste Substanz aus dieser Inhibitorklasse ist das bereits in klinischen Studien verwendete CX-4945 (Silmitasertib), welches CK2 α im niedrig nanomolaren Bereich ATP-kompetitiv hemmt, oral verfügbar ist und eine antiproliferative Wirkung in verschiedenen Tumoren zeigt [117,118].

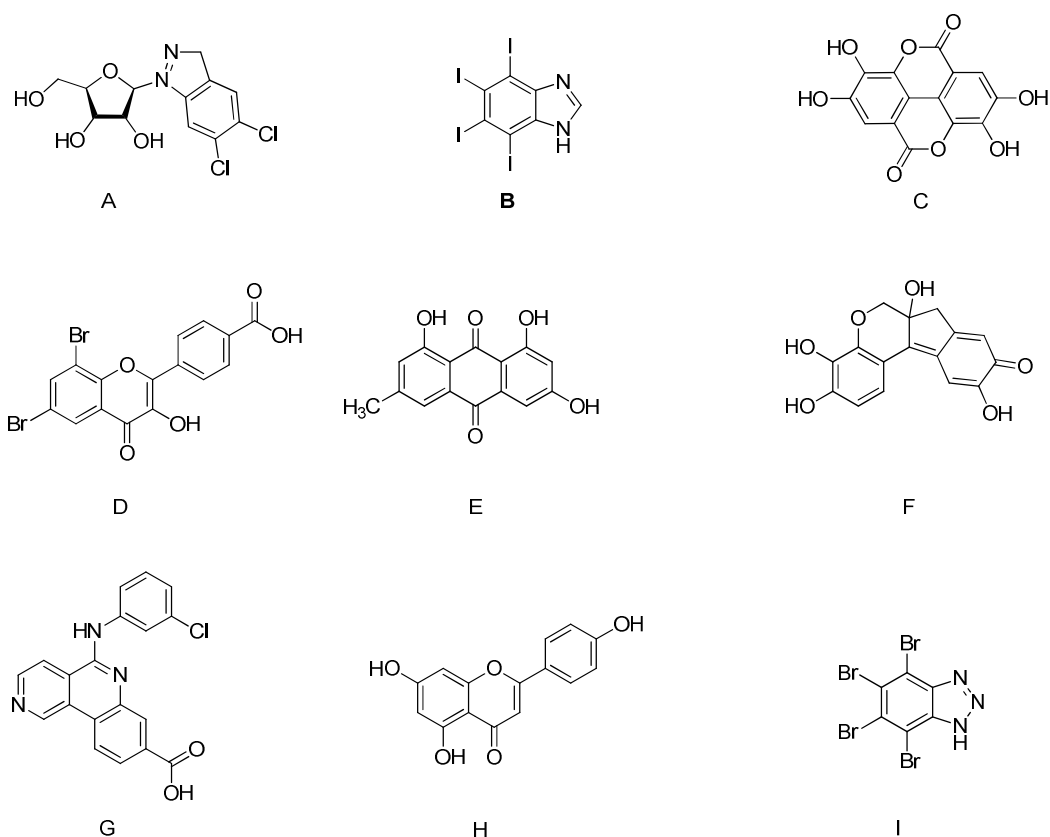


Abb. 12 ATP-kompetitive CK2 Inhibitoren

In dieser Abbildung sind einige bekannte CK2-Inhibitoren zu sehen. Zum einen der zuerst entdeckte DRB (A; $IC_{50} = 13 \mu M$). Dann TBB (I; $IC_{50} = 1 \mu M$) und sein Derivat TBI (B; $IC_{50} = 0,5 \mu M$). Außerdem die zwei synthetischen Inhibitoren FLC26 (D; $IC_{50} = 9 nM$) und CX4945 (G; $IC_{50} = 1 nM$). Des Weiteren gibt es Naturstoffe wie Apigenin (H; $IC_{50} = 0,8 \mu M$) Ellagsäure (C; $IC_{50} = 0,05 \mu M$), Emodin (E; $IC_{50} = 0,89 \mu M$) und Hematein (F; $IC_{50} = 0,55 \mu M$) zu sehen, welche in der Lage sind CK2 ATP-kompetitiv zu hemmen.

1.5.2 CK2-Inhibitoren, die nicht ATP-kompetitiv wirken

Es sind mehrere Angriffspunkte für nicht ATP-kompetitive Inhibitoren der CK2 bekannt. Zum einen wäre da die acidophile Substratspezifität der CK2. Aufgrund der Acidophilie der CK2 hat diese viele basische Reste, an welche negativ geladene Moleküle binden können. Es ist eine Vielzahl negativ geladener Kohlenhydrate bekannt, die in der Lage sind mit CK2 zu interagieren [119,120]. Hierzu zählt auch Heparin, welches die CK2 α kompetitiv hemmt [121,122]. Heparin steht jedoch aufgrund seiner negativen Ladung nicht im Fokus als Inhibitor, da hierdurch eine Aufnahme in die Zelle verhindert wird.

Eine Sonderform der Substratinhibitoren stellen Peptide dar, welche mutmaßlich an Substrate binden und so vor dem sauren Phosphoakzeptor abschirmen. Durch diese Bindung wird eine Phosphorylierung der Substrate durch CK2 verhindert. Hierzu zählt z. B. das Peptid P15 (vgl. Abb. 13) [123]. Gekoppelt an das zellpenetrierende Peptid Tat zeigte es *in vivo* ein proapoptotisches und antitumorales Verhalten [124]. In der Kombination mit dem Tat-Peptid ist dieser Inhibitor als CIGB-300 bekannt und hatte in ersten Studien das Vermögen Tumore innerhalb eines Jahres schrumpfen zu lassen [125]. Ähnlich wie für CX-4945 (s. q 1.5.1) gibt es erste Untersuchungen in vorklinischen Studien zu einer Kombinationstherapie mit Zytostatika [126]. Als wesentliches Target wurde das multifunktionelle Onkoprotein Nucleophosmin/B23 identifiziert, das durch CIGB-300 vor einer Phosphorylierung durch CK2 geschützt wird [127].

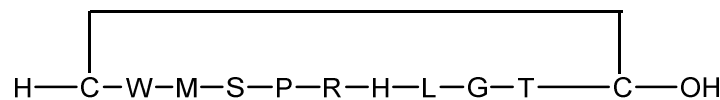


Abb. 13 Peptid P15:

Sequenz des Peptids P15, welches an die saure Akzeptorsubstratbindungsstelle der CK2 bindet.

Weiterhin kann eine zweite Bindungsstelle abseits der ATP-Bindungsstelle und der CK2 α /CK2 β -Grenzfläche anvisiert werden. Zu Inhibitoren dieser Bindungsstelle zählen die Polyoxometallate (POM, s. Abb. 14), eine Klasse anorganischer Substanzen, welche aus Übergangsmetall-Oxyanionen bestehen und über Sauerstoffatome miteinander verbunden sind. POMs sind Aggregate von Übergangsmetallen Oxoliganden und werden in Lösung durch Kondensation von beispielweise MO_4^{n-} gebildet.

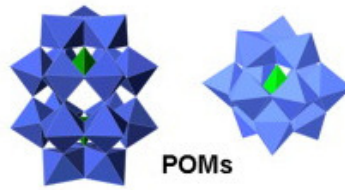


Abb. 14 Struktur von Polyoxometallate:

Zwei mögliche dreidimensionale Strukturen der POMs. Entnommen aus *Prudent und Cochet* 2009 [107] mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

POMs binden an das Aktivierungssegment der CK2 und weisen gegenüber dem Enzym eine gemischte Hemmung auf. Die gemischte Hemmung wird auch als nicht-kompetitive Hemmung bezeichnet, da der Inhibitor nicht an die Substratbindungsstelle bindet und nicht mit diesem konkurriert. Der Inhibitor sorgt für eine Konformationsänderung und er wird nicht durch das Vorhandensein des Substrats beeinflusst. Wahrscheinlich stören sie die sonst konstitutive Aktivität der CK2 α und überführen sie in eine inaktive Form [128].

1.5.3 CK2 β -Untereinheit

Die Bindung der CK2 β -Untereinheit ist zur Rekrutierung und Bindung einiger Substrate notwendig. Zudem moduliert sie die Substratspezifität und die katalytische Aktivität der CK2 α . Die CK2 β -Untereinheit kann auf zwei Arten Angriffspunkt für Inhibitoren sein. Ein Ansatz besteht in der Hemmung der CK2 β -abhängigen Rekrutierung von Substraten durch Bindung eines Inhibitors verhindert werden. Ein Beispiel hierfür ist das Peptid P1 (s. Abb. 15), welches an den N-Terminus der CK2 β bindet, ohne dabei die Formierung des CK2-Holoenzym in irgendeiner Form zu stören [129].

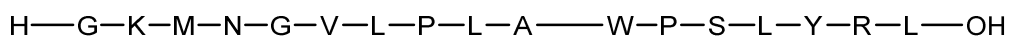


Abb. 15 Struktur des Peptids P1:

Sequenz des Peptids P1 (Aminosäuren im Einbuchstaben-Code), welches mit hoher Affinität an den N-Terminus der CK2 β bindet und auf diese Weise mit endogenen Bindungspartner konkurriert.

Ein weiteres Konzept, welches sich in dieser Arbeit hauptsächlich gewidmet wird, ist die Störung der CK2 α /CK2 β -Interaktion. Es wurde bereits gezeigt, dass die beiden Untereinheiten CK2 α und CK2 β nebeneinander koexistieren können, ohne das Holoenzym zu formen [51,130]. Hierzu wurde ein strukturbasierter Ansatz verwendet, für den ein Abschnitt der CK2 β genauer analysiert wurde. Ein Teil des C-Terminus der CK2 β zeigt weg vom Proteinkern und formt dabei eine β -Haarnadel-Schleife, welche an eine oberflächliche hydrophobe Tasche der CK2 α bindet. Diese Bindung wurde mittels Mutationsstudien genauer analysiert und es stellte sich heraus, dass ein Teil dieser hydrophoben Reste die Bindung der CK2 β an die α -Untereinheit vermittelt. Basierend auf dieser Studie wurde durch *Laudet et al.* [8] das zyklische Peptid Pc entwickelt, welches den C-terminalen Abschnitt der CK2 β imitiert

und so eine Bindung der CK2 β antagonisiert. Pc und einige seiner Derivate werden in dieser Arbeit näher behandelt. Die Sequenz des zyklischen Peptids Pc und die Kristallstruktur der CK2 α im Komplex mit Pc sind in Abb. 16 zu sehen [7,8,131].

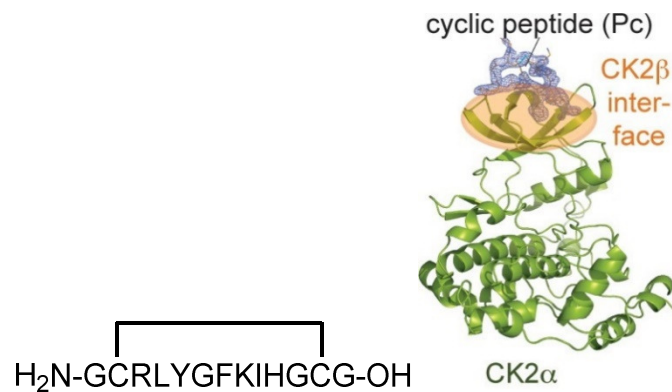
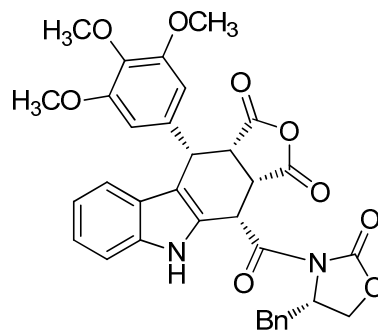


Abb. 16 Sequenz des zyklischen Peptids Pc:

Aminosäuresequenz (links) und Struktur des Peptids Pc gebunden an die CK2 β -Bindungsstelle in der β 4/ β 5-Schleife der CK2 α -Untereinheit (PDB: 4IB5). Kristallstruktur entnommen aus Raaf *et al.* 2013. [131] Mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

Mit Hilfe der Kristallstruktur von CK2 α im Komplex mit DRB (PDB: 3H30) wurde diese Bindungsstelle nahe der CK2 α /CK2 β -Grenzfläche, genauer an der Oberfläche des N-terminalen β -Faltblattes der CK2 α , ebenfalls nachgewiesen. DRB ist somit ein dualer Inhibitor, welcher sowohl im aktiven Zentrum (ATP-Bindungsstelle) als auch an einer allosterischen Bindungsstelle der CK2 α bindet, jedoch eine zu geringe Affinität zu letzterer Bindungsstelle aufweist, um die Interaktion von CK2 α und CK2 β zu stören [132]. Mit den Podophyllotoxin Indol-Analoga wurde jedoch eine weitere Substanzklasse identifiziert, welche ebenfalls an die allosterische Bindungsstelle der CK2 α bindet [133]. Aus dieser Substanzklasse wurden insgesamt drei Moleküle identifiziert, die eine höhere Affinität als DRB zeigen und die CK2 α ATP-nichtkompetitiv hemmen. Der potenteste Inhibitor war hierbei Verbindung W16 (s. Abb. 17). *Laudet et al.* [133] zeigten, dass die Bindung von CK2 β und dem zyklischen Peptid Pc an CK2 α durch die drei Substanzen geschwächt wird. Aufgrund der Hemmung der Aktivität von CK2 α wird eine allosterische initiierte Veränderung der Struktur von CK2 α vermutet.



W16

Abb. 17 Struktur des Inhibitors W16:

Strukturformel des Inhibitors W16, welcher an die allosterische Bindungsstelle der CK2 α bindet und so die Formation des CK2-Holoenzym unterdrückt [133].

2 Zielsetzungen

Die CK2 wird mit einer Vielzahl an Erkrankungen zusammengebracht. Hierzu zählt insbesondere die Überexpression der CK2 in einer Fülle von Tumoren. Dies ist ein Grund weshalb es so wichtig ist selektive Inhibitoren für diese Proteinkinase zu finden. Da die ATP-Bindungsstelle ein weit verbreitetes Target für die Entwicklung von Proteinkinase-Inhibitoren ist, diese jedoch hochkonserviert zwischen den einzelnen Proteinkinasen ist, wird nach möglichen neuen Interaktionsstellen mit Proteinkinasen gesucht. Für die CK2 sind einige weitere Angriffspunkte zur Entwicklung von Inhibitoren bekannt, wie allosterische, substratkompetitive, CK2 β -bindende oder CK2 β -kompetitive Inhibitoren [107]. Letztere sollten in dieser Arbeit genauer untersucht bzw. identifiziert werden. CK2 β -kompetitive Inhibitoren sollen zu selektiveren Inhibitoren führen, da die Interaktion der beiden CK2-Untereinheiten an der CK2 α /CK2 β -Grenzfläche hochkonserviert für diese Proteinkinase ist. Eine Inhibition der CK2 α /CK2 β -Interaktion soll zur Dissoziation des Holoenzym führen und damit zu einer fehlenden Phosphorylierung von Substraten führen, welche das CK2-Holoenzym zur Phosphorylierung benötigen (Klasse III-Substrate).

Zu diesem Zweck wurde in der vorliegenden Arbeit ein FA-Assay, dessen Entwicklung bereits vor dem Start dieser Arbeit begonnen wurde, zur weiteren Testung optimiert. Dieser sollte Substanzen identifizieren, welche mit einem fluoreszenzmarkierten CK2 β -nachahmenden Peptid (CF-Ahx-Pc) um die Bindung an CK2 α konkurrieren können. Hierzu sollten zum einen Derivate des literaturbekannten zyklischen Peptids Pc [8], zum anderen Derivate der in der Literatur ausführlich beschriebenen Substanz W16 [133] untersucht werden. Ebenfalls sollte ein Screening einer Substanzbibliothek bekannter ATP-kompetitiver CK2-Inhibitoren [107,134–136] in Hinsicht auf ihr CK2 β -kompetitives Verhalten erfolgen. Ebenfalls sollte eine weitere Messmethode für CK2 β -kompetitive Substanzen etabliert werden, hierbei fiel Wahl auf die Thermophorese, da hier nur geringe Probenmengen benötigt werden.

Da die im FA-Assay verwendeten CK2-Untereinheiten in *E. coli* exprimiert werden sollte in dieser Arbeit ein eukaryotisches Überexpressionssystem mit HEK293-EBNA-Zellen entwickelt werden, um eventuelle posttranslationale Modifikationen zu ermöglichen. Diese sollten dann ebenfalls im FA-Assay sowie MST getestet werden.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Detektion von Protein-Protein-Interaktionen

Die Wichtigkeit bzw. Bedeutung von PPIs wurde bereits in Kapitel 1.1 erläutert; hier soll kurz auf die verschiedenen Möglichkeiten zur Detektion von PPIs eingegangen werden und die in dieser Arbeit genutzten Messmethoden genauer vorgestellt werden.

Zur Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionen können heutzutage zahlreiche Messverfahren herangezogen werden. Diese werden in biophysikalische, biochemische und genetische Verfahren unterschieden. Zu den biophysikalischen Methoden zählen u. a. Fluoreszenz-Anisotropie- (FA) bzw. Fluoreszenz-Polarisationassays (FP), Surface Plasmon Resonance Spectroscopy (SPR-Spektroskopie), Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), Circular dichroismus (CD), statische und dynamische Lichtstreuung (SLS/DLS), Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) und Microscale-Thermophorese (MST). Die biochemischen Methoden umfassen u. a. Fluoreszenz- und Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET/BRET), AlphaScreen, Proteinfragment-Komplementierungsassay (PcA), Affinitätschromatographie und Crosslinking. dient dazu, ein oder mehrere Proteine über kovalente Bindungen mittels eines Crosslinkers zu vernetzen. Diese Technik kann für die Charakterisierung von PPIs mit geringer Affinität oder zur Stabilisierung dynamischer PPIs genutzt werden. Crosslinking ist immer mit einer weiteren nachgeschalteten Methode verknüpft, wie SDS-PAGE, Immunoaffinitäts-Chromatographie oder MS-Techniken. Zu den genetischen Verfahren zählen der Phagen-Display, das *Yeast-Two-Hybrid*-System und Protein-Microarrays. All diese Methoden haben ihre Vor- und Nachteile in Bezug auf Aufwand, Probenverbrauch und Kosten. In Tab. 1 sind einige Vor- und Nachteile ausgewählter biophysikalischer Methoden, die in dieser Arbeit angewendet wurden, aufgelistet [137]-

Tab. 1 Biophysikalische Messmethoden zur Analyse von PPI:

Überblick über die Vor- und Nachteile, den Affinitätsbereich sowie den Verbrauch an Probenmaterial verschiedener in dieser Arbeit angewendeter biophysikalischer Methoden. Angelehnt an *Zhou et al.* (2016) [137]

Methode	Vorteile	Nachteile	Affinitätsbereich	Verbrauch
FA	Automatisierte High-Throughput, „Mischen und Messen Format“, niedrige Kosten	Beruht auf einer großen Größenänderung, Probleme mit Autofluoreszenz, Quenching und Lichtstreuung	nM – mM	Dutzende µl mit nM-Konzentration pro Datenpunkt
ITC	Labelfrei, liefert thermodynamische Parameter	Niedriger Durchsatz und Sensitivität, lange Vorbereitungszeit, Pufferlimitierung	nM – unterer mM	Mehrere hundert µg pro Assay
MST	Schnelle Messzeit, niedriger Probenverbrauch	Fluoreszenzmarkierung wird für typische MST benötigt	pM – mM	Mehrere µl mit nM-Konzentration

In dieser Arbeit wurden insbesondere die Methoden FA und MST angewendet; daher werden die theoretischen Grundlagen dieser beiden Methoden in den folgenden zwei Kapiteln näher vorgestellt [137]. Diese beiden Methoden werden mit ITC-Messungen verglichen, welche im Institut für Biochemie der Universität Köln durchgeführt wurden. Bei der ITC werden ebenfalls biophysikalische Daten zu Bindungsprozessen gewonnen. Hierbei können über die Bindungswärme zweier Bindungspartner Aussagen über die Bindungskonstante und die Stöchiometrie der Reaktion getroffen werden.

3.2 Theoretischer Hintergrund der Fluoreszenz-Anisotropie

Bei der Fluoreszenz-Polarisation handelt es sich, wie bereits oben beschrieben, um eine weitere Methode zur Quantifizierung von PPIs. Diese Messmethode nutzt polarisiertes Licht zur Anregung von Fluoreszenzmolekülen und die anschließende Quantifizierung [138,139]. Mit Hilfe eines Polarisationsfilters kann ein Vektor des natürlichen Lichtes isoliert werden und so polarisiertes Licht erzeugt werden. Die Kennzeichnung von polarisiertem Licht ist, dass sein elektrischer Vektor nur genau eine Richtung hat [140,141].

Polarisation ist definiert als Funktion der parallelen und perpendicularen Intensitäten.

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad \text{Gl. 1}$$

P ist dabei die Polarisierung, I_{\parallel} die parallele und I_{\perp} die perpendikuläre Intensität. Durch polarisiertes Licht können nur Moleküle angeregt werden, deren Absorptionsdipole genau richtig zu dem einen Vektor orientiert sind. Tritt dieser Fall ein, wird das mesomere delokalisierte π -Elektronensystem des Moleküls auf ein höheres Energieniveau gehoben. Je nach der Fluoreszenzlebensdauer verbleiben die Elektronen dort für wenige Nanosekunden bis zu einigen 10 Nanosekunden. Anschließend kehren sie wieder in ihren Grundzustand zurück und emittieren dabei Licht. Die Grenzen der Polarisierung sind, wenn das emittierte Licht vollständig in der Richtung des anregenden elektrischen Vektors verbleibt, also in der parallelen Richtung [140–143].

$$P = \frac{1 - 0}{1 + 0} = 1 \quad \text{Gl. 2}$$

Ist genau das Gegenteil der Fall, ist die Emission vollständig in der perpendikulären Richtung.

$$P = \frac{0 - 1}{0 + 1} = -1 \quad \text{Gl. 3}$$

Die Grenzen der Polarisierung liegen also zwischen 1 und -1. Diese Grenzen werden beispielsweise in Kristallen erreicht. Ein weiterer Begriff im Zusammenhang mit Polarisierung ist die Anisotropie, A oder auch r genannt. [142,144] Diese ist folgendermaßen definiert:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad \text{Gl. 4}$$

Die Grenzen der Anisotropie liegen demnach zwischen 1 und -0,5. In Lösungen können die Grenzen der Polarisierung und Anisotropie niemals erreicht werden. Polarisierung und Anisotropie lassen sich auch miteinander in einen Zusammenhang bringen:

$$r = \frac{2}{3} \left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3} \right)^{-1} \quad \text{Gl. 5}$$

Daraus resultiert letztendlich folgender Zusammenhang von Polarisierung und Anisotropie:

$$r = \frac{2P}{3 - P} \quad \text{Gl. 6}$$

Die während eines Experiments gemessene Fluoreszenz-Polarisierung ist abhängig von der Rotationsdiffusionsrate bzw.-konstante eines Moleküls [140,145]. Sie hängt also von der Beweglichkeit des Fluoreszenzmoleküls ab. Wird ein Fluoreszenzmolekül in einem starren Raum angeregt, in dem es sich nicht bewegen kann, ändert sich die Polarisierung von anregendem und emittiertem Licht nicht. Ist es hingegen so, dass das Molekül in seiner Beweglichkeit nicht eingeschränkt ist, wird die Polarisierung davon beeinflusst. Das Ausmaß der bei der Anregung stattfindenden Rotation hängt davon ab, wie schnell das Molekül in der Lage ist, zu rotieren. Diese ist umso langsamer, je größer ein Molekül ist und je viskoser das umgebende Lösemittel ist. Sie verkleinert sich auch durch Bindung an ein Makromolekül [143,146].

Dabei ist nur das Zeitintervall von Interesse, in dem es zu einer solchen Rotation kommen kann. Es ist abhängig von der Fluoreszenzlebensdauer des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes. Je geringer die Fluoreszenzlebensdauer ist, desto geringer ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass das Molekül in der Lage ist, die Polarisation durch Rotation stark zu beeinflussen.

Findet keine Rotation statt, spricht man auch von intrinsischer Polarisation P_0 . Anhand von Gleichung 7 lässt sich feststellen, dass diese von der Anregungswellenlänge abhängt.

$$\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} = \frac{5}{3} = -\left(\frac{2}{3 \cos^2 \Phi - 1}\right) \quad \text{Gl. 7}$$

Φ ist dabei als Winkel zwischen Absorptions- und Emissionsdipolen definiert. Diese Formel lässt sich auch für die quantitative Auswertung der Polarisation in leicht umgewandelter Form verwenden. In diesem Fall wird statt Φ als Winkel ω als Winkel, in dem das Fluorophor zwischen Extinktion und Emission rotiert, bezeichnet [147].

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3}\right) \left(\frac{2}{3 \cos^2 \omega - 1}\right) \quad \text{Gl. 8}$$

P steht dabei für die beobachtete Polarisation während einer Messung. *Perrin* entwickelte diese Formel weiter, indem er eine Relation zwischen Fluoreszenzlebensdauer und der Rotationsdiffusion eines Fluoreszenzmoleküls herstellte.

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3}\right) \left(1 + \frac{RT}{\eta V} \tau\right) \quad \text{Gl. 9}$$

Die neu hinzugekommen Variablen R , T , η , V und τ stehen dabei für die universelle Gaskonstante, die absolute Temperatur, die Viskosität, das effektive molare Volumen des Fluoreszenzmoleküls und die Fluoreszenzlebensdauer. Diese Gleichung lässt sich mit Hilfe der *Debye*-Rotationsrelaxationszeit (ρ) noch weiter vereinfachen.

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3}\right) \left(1 + \frac{3\tau}{\rho}\right) \quad \text{Gl. 10}$$

Diese steht für die Zeit, welche dazu benötigt wird, für eine bestimmte Orientierung durch einen Winkel von arccosinus e^{-1} zu rotieren. Dieser Winkel beträgt 68,42°. Für sphärische Moleküle ergibt sich deswegen:

$$\rho_0 = \frac{3\eta V}{RT} \quad \text{Gl. 11}$$

ρ_0 ist die Rotationskorrelation; diese ist für sphärische Proteine folgendermaßen definiert:

$$\rho_0 = \frac{3\eta M(v + h)}{RT} \quad \text{Gl. 12}$$

M ist dabei die molekulare Masse des Proteins, v das partielle spezifische Volumen des Proteins und h der Grad der Hydratation.

3.2.1 Versuchsaufbau der Fluoreszenz-Anisotropie

Der Versuchsaufbau für die Messung der Fluoreszenz-Anisotropie oder Fluoreszenz-Polarisation ist in Abb. 18 zu sehen.

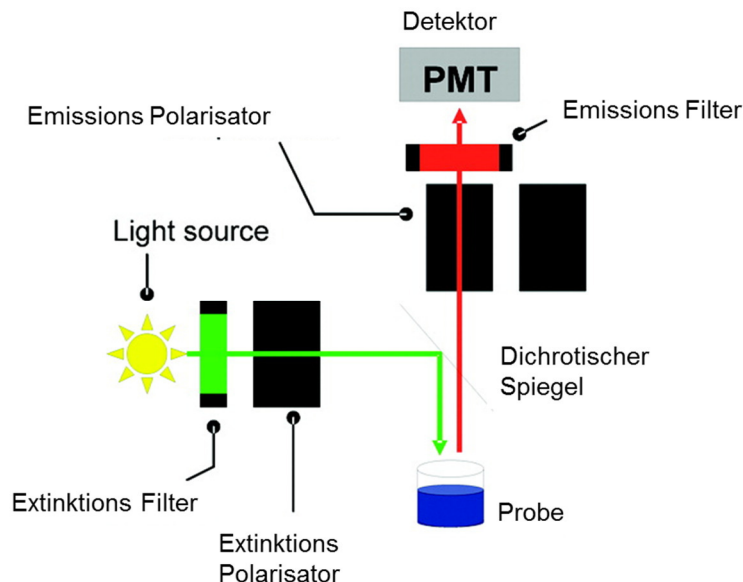


Abb. 18 Schematischer Versuchsaufbau für die Fluoreszenz-Anisotropie-Messung:

Monochromatisches Licht passiert einen vertikalen Polarisator und wird anschließend auf die Probe gelenkt, um dort Fluoreszenzmoleküle anzuregen. Nur Moleküle mit der richtigen Orientierung werden angeregt und emittieren Licht, das sowohl in der horizontalen als auch vertikalen Ebene gemessen wird. Abbildung verändert nach *Jameson et al.* 2003 mit freundlicher Genehmigung der American Chemical Society [143].

Hierbei wird durch eine Lichtquelle monochromatisches Licht ausgestrahlt. Dieses wird dann mit Hilfe eines Polarisationsfilters linear polarisiert. Mit dem polarisierten Licht wird im Anschluss die Probe bestrahlt und regt dort Fluoreszenzmoleküle an. Dabei ist das polarisierte Licht nur in der Lage Moleküle anzuregen, welche genau passend zur Ausrichtung des elektrischen Vektors orientiert sind. Am Ende wird die Polarisation des emittierten Lichtes bestimmt. Dies geschieht durch Messung der parallelen und perpendicularen Intensitäten des emittierten Lichtes. Bleiben Temperatur und Viskosität der Probe gleich, so ist die Polarisation nur abhängig von der Größe des Fluoreszenzmoleküls [143,146]. Ist dieses relativ klein, so wird es durch Absorption des polarisierten Lichtes in eine schnelle Rotation gebracht und das emittierte Licht wird depolarisiert. Bindet das Fluoreszenzmolekül aber beispielsweise an ein Protein, so vergrößert sich das molekulare Volumen stark. Wird das Fluoreszenzmolekül nun angeregt, ist die darauffolgende Rotation weitaus langsamer und das emittierte Licht verbleibt mehr polarisiert [143,146]. Siehe hierzu Abb. 19 [148].

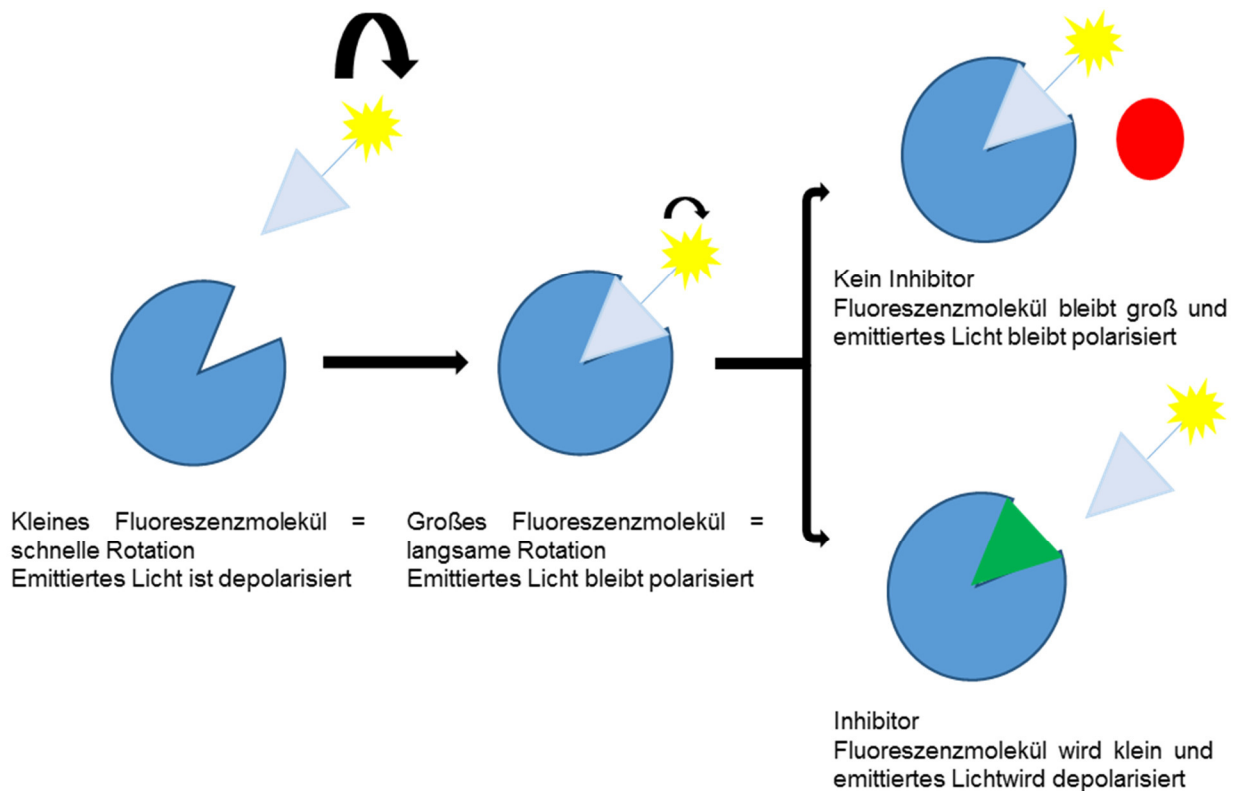


Abb. 19 Schematische Darstellung der Reaktion bei der Fluoreszenz-Anisotropie:

Ein kleines Fluoreszenzmolekül kann schnell rotieren, wenn es ungebunden vorliegt, wobei das emittierte Licht depolarisiert ist. Bindet dieses Molekül nun an einen Bindungspartner, verändert sich die Größe des Fluoreszenzmoleküls; es rotiert langsamer und mehr emittiertes Licht verbleibt polarisiert. Das Fluoreszenzmolekül kann nun verdrängt werden, was wiederum zu einer Veränderung der Polarisation des emittierten Lichts führt. Angelehnt an *Bachovchin et al.* 2002 [148] und mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group.

Es können nun auch Konkurrenzexperimente durchgeführt werden, um Substanzen zu finden, welche in der Lage sind, das Fluoreszenzmolekül vom Protein zu verdrängen. Ist eine Substanz in der Lage, dies zu tun, wird das molekulare Volumen des Fluoreszenzmoleküls wieder kleiner, und das Licht wird wieder depolarisiert. Ist dies nicht der Fall, verbleibt das Licht polarisiert (s. Abb. 19)

3.3 Theoretischer Hintergrund zur Microscale Thermophorese

Im Jahr 1856 beschrieb Carl Ludwig als Erster einen Vorgang, welcher als Thermophorese bezeichnet wird. Bei diesem bewegen sich Moleküle innerhalb eines Temperaturgradienten. Der Temperaturgradient sorgt in einer wässrigen Lösung nicht nur dafür, dass die Wärme verteilt wird, sondern auch für eine gerichtete Bewegung der Moleküle [149,150]. Der genaue Mechanismus hinter der Thermophorese in Lösungen konnte bis heute nicht völlig geklärt werden [151–154]. Auch die Richtung der Thermophorese lässt sich nicht genau vorhersagen. Es gibt so genannte thermophobe Stoffe, welche aus dem Temperaturgradienten weg zu den kälteren Zonen wandern, und thermophile Stoffe, welche in Richtung des warmen Punktes wandern [155]. Bislang gibt es zur Thermophorese verschiedene Erklärungsansätze. Die

ersten systematischen Studien zu diesem Effekt wurden im 19. Jahrhundert in Salzlösungen durchgeführt. Die Thermophorese, auch Soret-Effekt genannt, wird oft damit erklärt, dass es sich um einen lokalen Nichtgleichgewichtseffekt handelt, welcher von Fluidodynamik, Kraftfeldern und Teilchen-Lösemittel-Potentialen abhängig ist. Ein weiterer Erklärungsversuch ist, dass es sich doch um einen lokalen thermodynamischen Gleichgewichtseffekt handelt. Dieser ist wahrscheinlich aber nur bei kleinen Temperaturänderungen der Fall. Allen Erklärungsversuche ist gemeinsam, dass die Grenzfläche zwischen Lösemittel und Molekül und damit auch die Ladung der Teilchen von großer Bedeutung für den thermophoretischen Effekt sind. Verändern sich bei einem Molekül durch Bindung bereits in geringer Weise die Konformation, die Ladung oder die Molekülgröße, ändert sich auch das thermophoretische Verhalten. Genau dies macht sich die Microscale-Thermophorese (MST) zu Nutze und erlaubt somit die Quantifizierung der Interaktion von Biomolekülen [155–158].

3.3.1 Grundlagen zur Thermophorese

Thermophorese ist, wie bereits erwähnt, ein Prozess, bei dem ein gerichteter Fluss von Molekülen innerhalb eines Temperaturgradienten stattfindet. Dieser Temperaturgradient ist dabei proportional zur Thermophorese. Dies kann durch die folgende Formel ausgedrückt werden:

$$j = -cD_T \text{ grad } T \quad \text{Gl. 13}$$

Dabei ist j der thermale Diffusionskoeffizient und D_T die Proportionalitätskonstante. Geht man nun von Gleichgewichtsbedingungen aus, sind Thermophorese und Massenstrom ausgeglichen, und es ergibt sich folgende Formel mit dem Diffusionskoeffizienten D und der Konzentration c :

$$j = -D \text{ grad } c \quad \text{Gl. 14}$$

Das Verhältnis von Diffusionskoeffizient D und Proportionalitätskonstante D_T gibt die durch die Thermophorese verursachte Konzentrationsänderung wieder:

$$S_T = \frac{D}{D_T} \quad \text{Gl. 15}$$

S_T ist der Soret-Koeffizient, der ein Maß dafür darstellt, wie sich die Stofftrennung im stationären Zustand in einem Temperaturgradienten verhält.

Betrachtet man nun einen gegebenen räumlichen Temperaturgradienten, dann lässt sich für die Gleichgewichtskonzentration folgende Formel aufstellen:

$$\frac{c_{hot}}{c_{cold}} = \exp(-S_T \Delta T) \quad \text{Gl. 16}$$

Die Quantifizierung von Affinitäten für die Interaktion von Biomolekülen kann mit Hilfe der Thermophorese erfolgen, da durch Bindungsreaktionen mindestens einer der folgenden Parameter verändert wird: Molekülgröße, Molekülladung, die Lösungsenthalpie und die Konformation der Moleküle. Unter konstanten Pufferbedingungen ist die Thermophorese in der Lage, diese Parameter zu untersuchen [155,158].

3.3.2 Versuchsaufbau zur MST

Bei der MST erfolgt die Detektion der Thermophorese mittels Fluoreszenzmessung. Dazu wird sichtbares Licht für die Anregung oder, bei einem Label-free-Ansatz, die Autofluoreszenz von Proteinen bei $\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 360 \text{ nm}$ genutzt. Für Fluoreszenz-gelabelte Moleküle gibt es drei mögliche Filtereinrichtungen:

1. Blau ($\lambda_{\text{Ex}} = 460\text{--}480 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Em}} = 515\text{--}530 \text{ nm}$)
2. Grün ($\lambda_{\text{Ex}} = 515\text{--}525 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Em}} = 560\text{--}585 \text{ nm}$)
3. Rot ($\lambda_{\text{Ex}} = 605\text{--}645 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Em}} = 680\text{--}685 \text{ nm}$)

Zur Auslösung der Thermophorese wird ein IR-Laser mit einer Wellenlänge von 1480 nm in den Weg der Fluoreszenzextinktion und -emission geschaltet. Dabei fokussiert der IR-Laser durch die gleichen optischen Einrichtungen, die auch zur Fluoreszenzdetektion genutzt werden (s. Abb. 20) [157].

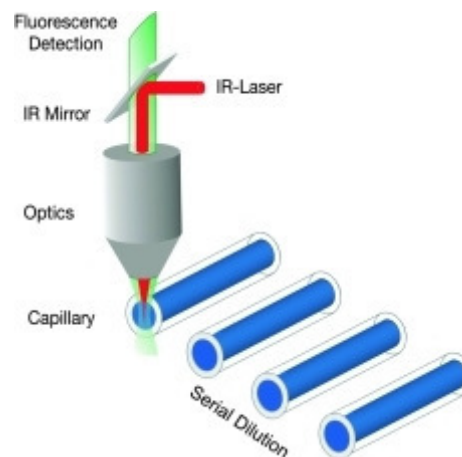


Abb. 20 Experimenteller Aufbau der MST-Messung:

Die serielle Verdünnungsreihe der Proben wird in Kapillaren gefüllt, die anschließend eine nach der anderen vermessen. Dazu wird mittels eines IR-Lasers lokal die Probe erhitzt und durch das gleiche optische Element die Änderung der Fluoreszenz gemessen. Mit freundlicher Genehmigung von NanoTemper Technologies.

Die Erzeugung des Temperaturgradienten mittels eines IR-Lasers hat einige Vorteile gegenüber einem Kontaktverfahren zur Erwärmung. Die Wassermoleküle im Puffer absorbieren die IR-Strahlung, und die Lösung erwärmt sich. Im Falle des IR-Lasers ist dieser Vorgang sehr präzise und reproduzierbar, da es sich um einen lokalen Temperaturanstieg handelt. Im Fall der MST wird so ein Temperaturanstieg von $1\text{--}6 \text{ K}$ erreicht. Gemessen wird

die Thermophorese in Glaskapillaren. Um reproduzierbare Temperaturgradienten zu erhalten, haben diese einen genau definierten inneren und äußeren Radius und sind aus reinem Glas gefertigt. Diese Voraussetzungen sorgen für eine nahezu konstante Absorption der IR-Laser-Energie. Die inneren Oberflächen der Kapillaren haben ebenfalls einen Einfluss auf die Qualität der Messungen. Standard ist dabei eine Behandlung der Kapillare, so dass eine möglichst homogene Oberfläche entsteht. Diese kann, um die Qualität der Messung zu verbessern, auch mit hydrophoben und hydrophilen Polymeren behandelt werden [156,157].

Da der eigentliche Vorgang der Thermophorese durch Fluoreszenzmessung detektiert wird, muss einer der Bindungspartner dafür entweder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden, oder es wird die Autofluoreszenz der Proteine gemessen. Für die Markierung der Proteine wird meistens eine Crosslinking-Reaktion mit einem N-Hydroxysuccinimid-(NHS)-Farbstoff genutzt. Dieser formt mit primären Aminogruppen, in diesem Fall mit den Seitenketten der Lysine innerhalb des Proteins, kovalente Bindungen. Eine weitere Möglichkeit zur Markierung sind Maleimid-Farbstoffe. Diese reagieren mit den Thiolgruppen der Cysteine eines Proteins. Diese Markierungsart ist in der Regel nicht so effektiv wie die des Crosslinking über NHS-Farbstoffe, da die meisten Proteine nur einen geringen Anteil an Cysteinen vorweisen. Bei beiden Crosslinking-Varianten kommt es zur randomisierten Markierung der Proteine. Die genaue Position der Fluoreszenzmoleküle ist somit nicht bekannt. Dies spielt für die MST-Messung keine Rolle und stellt sogar eher einen Vorteil dar. Durch die randomisierte Markierung der Moleküle können Effekte, die eventuell eine lokalisierte Markierung haben, minimiert werden [157].

Weitere Markierungsmöglichkeiten sind eine Verlinkung von Puromycinderivaten mit einem Fluorophor [159], die Einführung nicht natürlicher Aminosäuren, entweder direkt mit einem Farbstoff versehen [160] oder mit der Möglichkeit der nachfolgenden chemischen Veränderung [161], Fusionsproteine (z. B. grünfluoreszierendes Protein, gelbfluoreszierendes Protein) oder auch die Einführung spezifischer Peptidsequenzen für eine Markierung.

3.3.3 Phasen der MST-Messung

Der K_D -Wert ist die Dissoziationskonstante und gibt Auskunft über die Affinität zwischen Molekülen. Je kleiner der Wert des K_D -Wertes ist, umso stärker ist die Affinität. Dazu darf der für die Thermophorese induzierte Temperaturanstieg nicht zu hoch ausfallen, da es sonst laut chemischem Gleichgewicht zu einer Erhöhung der Bindungswahrscheinlichkeit kommen würde [156].

Eine typische MST-Messung setzt sich aus fünf Phasen zusammen, die in Abb. 21 dargestellt sind:

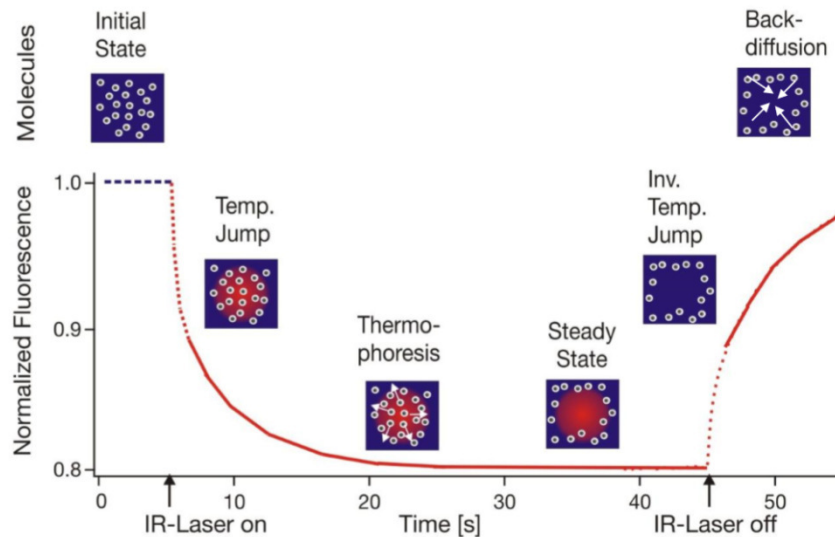


Abb. 21 Typisches MST-Signal:

Hier ist das typische Signal einer MST-Messung zu sehen. Zu Beginn wird die initiale Fluoreszenz der Probe gemessen, bevor der IR-Laser eingeschaltet wird. Sobald dieser eingeschaltet wird, kommt es zu einem Temperatursprung (T-Jump) und damit zu einer Absenkung der Fluoreszenz. Gleich darauf folgt die eigentliche Thermophorese. Insgesamt wird das Absinken der Fluoreszenz über ca. 30 s gemessen und anschließend der IR-Laser wieder abgeschaltet. Darauf folgt ein inverser T-Jump und anschließend die Rückdiffusion der Moleküle, was beides wiederum einen Anstieg der Fluoreszenz zur Folge hat. Mit freundlicher Genehmigung von NanoTemper Technologies.

Zu Beginn einer jeden Messung wird zunächst die initiale Fluoreszenz gemessen. Diese sollte zwischen allen Proben maximal um die 10 % schwanken. Sind große Änderungen zu beobachten, kann dies bereits ein Hinweis auf den Bindungsstatus des fluoreszenzmarkierten Moleküls sein bzw. auf eine Aggregation der Moleküle hindeuten. In einem solchen Fall muss ein zusätzlicher SDS-Denaturierungs-Test (SD-Test) durchgeführt werden. Dieser gibt Aufschluss darüber, ob ein Verlust an Fluoreszenzsignal durch ein Bindungsereignis verursacht wurde. In diesem Fall würde man nach dem SD-Test wieder ein konstantes Fluoreszenzsignal erhalten, da aufgrund von Denaturierungsbedingungen diese Bindung wieder aufgebrochen wird. Lässt sich dies nicht zeigen, ist die Verminderung des Fluoreszenzsignals nur durch Aggregation oder Absorption der Proteine an die Wände der Reaktionsgefäße erklärbar [156,157].

Nach der Messung der initialen Fluoreszenz wird der IR-Laser eingeschaltet, und es kommt zur Ausbildung des Temperaturgradienten von 1–6 K. Quasi gleichzeitig mit dem Einschalten des Lasers kommt es zum sogenannten T-Jump. Dieser hat eine Zeitdauer von wenigen 100 ms und gibt die durch den Temperaturgradienten verursachte drastische Veränderung der gemessenen Fluoreszenz wieder. Er erfolgt dabei genauso schnell wie der Temperaturanstieg. Der T-Jump kann bereits Auskunft über die Interaktion geben, da eine Bindung in der Nähe eines der Fluoreszenzmoleküle bereits zu einer Änderung der

Konformation des fluoreszenzmarkierten Moleküls führt, welche wiederum temperaturabhängig ist. [156,157].

Der T-Jump lässt sich durch die Wahl des Fluoreszenzfarbstoffes beeinflussen, da jeder dieser Stoffe eine andere Temperaturabhängigkeit aufweist und so ein unterschiedliches Fluoreszenzverhalten zeigt. Ebenfalls kann der T-Jump eine Aussage über die Rigidität eines Molekülgerüsts aufgrund von ausgebildeten Dipolen geben. Auch diese werden durch eine Bindung verändert, was dann durch die gemessene Fluoreszenz detektiert werden kann [156,157].

Die dritte Phase der MST-Messung ist die Thermophorese selbst. Sie benötigt einen Zeitraum von mehreren Sekunden und lässt sich somit leicht vom T-Jump unterscheiden. Eine Signifikanz für das Signal der Thermophorese zeigt sich in etwas mehr als einer Sekunde nach Einschalten des IR-Lasers. Da die Thermophorese nicht nur allein von der Änderung der Molekülgröße abhängt, können in diesem Fall auch kleinere Bindungspartner bis hin zu Ionen detektiert werden. Weiterhin stellt sie im Vergleich zum zuvor stattgefunden T-Jump keinen lokalen Effekt dar. Sie gibt wieder, wie sich Änderungen auf den Diffusionskoeffizienten D und die Proportionalitätskonstante D_T auswirken. Dies lässt sich wiederum aus der Änderung der Fluoreszenzintensität ermitteln [156,157].

Nach Abschalten des IR-Lasers kommt es dann zum inversen T-Jump. Da es nun nicht weiter zur Erwärmung der Probe kommt und der Temperaturgradient schnell wieder verschwindet, kann die Fluoreszenzintensität zu Beginn der Messung nahezu wieder hergestellt werden. Der inverse T-Jump umfasst, ähnlich wie der T-Jump, zu Beginn der Messung nur eine sehr kurze Zeitspanne. Anschließend kommt es zur Rückdiffusion der Moleküle aufgrund eines inhomogen Konzentrationsgefälles innerhalb der Probe. Die hierbei zu messende Fluoreszenzänderung kommt deswegen nur durch Massenströmung zustande. Aber auch hier kann eine Aussage über die Qualität der Messung getroffen werden. Die Änderungen in der Molekülgröße nach Bindung haben zur Folge, dass die Massenströmung langsamer ist, als wenn das fluoreszenzmarkierte Molekül ungebunden vorläge. Ist jedoch keine Änderung der Molekülgröße während des gesamten Experiments zu sehen und erfolgt die Rückdiffusion langsamer, weist dies wiederum auf eine Aggregation oder Oligomerisation der Moleküle hin [157].

3.3.4 Evaluierung der MST-Signale

MST-Messungen sind Gleichgewichtsexperimente. Hierbei wird der unmarkierte Bindungspartner titriert und das fluoreszenzmarkierte Molekül konstant gehalten. Die Konzentration des fluoreszenzmarkierten Moleküls sollte dabei optimalerweise ca. 10-fach

über dem erwarteten K_D liegen [157]. Die relative Fluoreszenz wird dabei aufgetragen, sie beträgt:

$$F_{Norm} = \frac{F_{hot}}{F_{cold}} \quad \text{Gl. 17}$$

F_{hot} ist dabei die Fluoreszenz, welche kurz nach Einschalten des IR-Lasers gemessen wird, sobald gebundene und ungebundene fluoreszenzmarkierte Moleküle voneinander unterschieden werden können. Für F_{cold} kann die initiale Fluoreszenz genutzt werden, wenn diese noch keinen Hinweis auf die Bindungssituation des fluoreszenzmarkierten Moleküls zulässt, also keine größeren Schwankungen zeigt. Oder der häufigere Fall ist aber, dass hierfür die Fluoreszenz kurz nach dem T-Jump eingesetzt wird.

Die Formel zur grundlegenden Berechnung lautet:

$$\frac{c_{hot}}{c_{cold}} = \exp(-S_T \Delta T) \quad \text{Gl. 18}$$

Sie kann in folgender Form linearisiert werden:

$$\frac{c_{hot}}{c_{cold}} = \exp(-S_T \Delta T) \approx 1 - S_T \Delta T \quad \text{Gl. 19}$$

Eine Linearisierung in dieser Form ist legitim, da die während der Messung verbrauchte Konzentration und der Temperaturgradient von 1–6 K vernachlässigbar klein sind. Daraus ergibt sich nachfolgend:

$$F_{Norm} = 1 + \left(\frac{\delta F}{\delta T} - S_T \right) \Delta T \quad \text{Gl. 20}$$

$\delta F / \delta T$ gibt dabei die Fluoreszenzänderung aufgrund der Temperaturabhängigkeit des Fluorophors wieder. Um nun Affinitäten berechnen zu können, wird die Änderung von F_{Norm} in Bezug auf die Fluoreszenzänderung betrachtet. Dies geschieht als Funktion des titrierten Bindungspartners, wobei sich die Zustände des ungebundenen und gebundenen Titranten linear überlagern. Der Anteil der teilweise gebunden ist (FB), wird dabei durch folgende Formel beschrieben:

$$F_{Norm} = (1 - FB)F_{Norm,ungebunden} + (FB)F_{Norm,gebunden} \quad \text{Gl. 21}$$

Mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes lassen sich die meisten simplen Bindungsvorgänge noch einfacher beschreiben. Dabei wird der Titrant als A beschrieben und das fluoreszenzmarkierte Molekül als B. Die Reaktionsgleichung in diesem Fall ist simpel und lautet:



Nach dem Massenwirkungsgesetz lässt sich der K_D nun folgendermaßen berechnen:

$$K_D = \frac{[A]_{frei} \cdot [B]_{frei}}{[AB]} \quad \text{Gl. 23}$$

Zur weiteren Berechnung müssen jedoch die absoluten Konzentrationen $[A]$ und $[B]$ herangezogen werden, da die freien Konzentrationen $[A]_{frei}$ und $[B]_{frei}$ nicht bekannt sind.

Das bedeutet für beide Reaktionspartner, dass die Differenz aus der absoluten Konzentration und der Konzentration des Reaktionskomplexes eingesetzt werden muss. Dadurch ergibt sich für K_D :

$$K_D = \frac{[A]_{frei} \cdot [B]_{frei}}{[AB]} = \frac{([A] - [AB]) \cdot ([B] - [AB])}{[AB]} \quad \text{Gl. 24}$$

Um nun mit Hilfe der gemessenen F_{Norm} -Werte den K_D zu berechnen, wird FB vom fluoreszenzmarkierten Reaktionspartner B genutzt, da so der K_D der einzige unbekannte Parameter ist. F_{Norm} und FB von B sind dabei in den Experimenten linear, und F_{Norm} kann somit direkt für FB eingesetzt werden. Die Formel zur letztendlichen Berechnung lautet:

$$FB \approx F_{Norm} = \frac{[AB]}{[B]} = \frac{[A] + [B] + K_D - \sqrt{([A] + [B] + K_D)^2 - 4[AB]}}{2[B]} \quad \text{Gl. 25}$$

Um eine sigmoidale Kurve zu erhalten, welche das Bindungsverhalten direkt wiedergibt, wird F_{Norm} auf der y-Achse in ‰ gegen die Konzentration des Titranten in logarithmischer Form auf der x-Achse aufgetragen. Es besteht die Möglichkeit, auch ΔF_{Norm} -Werte auf der y-Achse aufzutragen, indem von F_{Norm} der Wert für den ungebundenen Zustand subtrahiert wird.

3.3.5 Güte von MST-Messungen

Aus den Rohdaten jeder Messung lassen sich bereits einige Informationen über die Güte der Messung ablesen. Dies kann durch bloße Betrachtung der Peaks für die initiale Fluoreszenz sowie der MST-Kurven geschehen.

Zeigen die Peaks der Kapillarscans-Messung Schultern, Doppelpeaks, starke Schwankungen oder sind unsymmetrisch, deutet dies auf eine Adsorption an eine Oberfläche hin, welche eine Änderung der Fluoreszenz verursacht (s. Abb. 22). Die Adsorption kann sowohl in den Reaktionsgefäßen und Pipettenspitzen als auch in den Glaskapillaren stattfinden.

Es kann zu einem konzentrationsabhängigen Verlust der Fluoreszenz kommen. In diesem Fall muss mittels eines SD-Tests geklärt werden, ob er auf Bindung oder Adsorption zurückzuführen ist. Lässt sich die Fluoreszenzintensität mittels SD-Test wieder herstellen, ist der Fluoreszenzverlust durch Bindung des fluoreszenzmarkierten Bindungspartners zu erklären, und die MST-Daten können verwendet werden. Ist dies nicht der Fall, müssen die Assaykonditionen für diese Messung optimiert werden [156].

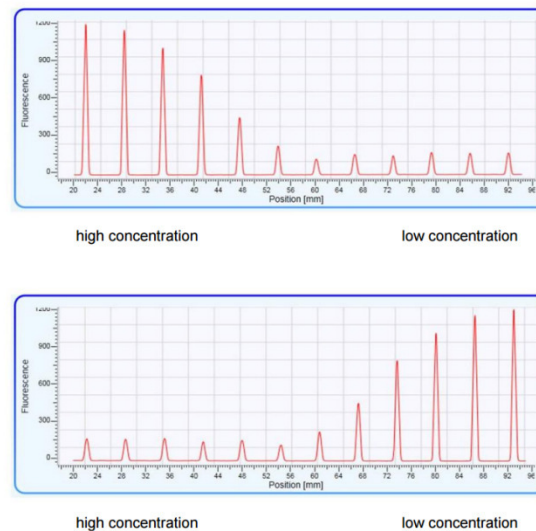


Abb. 22 Verlust des Fluoreszenzsignals:

Beispielhafter Kapillarscan zur Verdeutlichung des konzentrationsabhängigen Verlustes an Fluoreszenzsignal bzw. der Veränderung über die einzelnen Kapillaren. Werden solche Signale in einem Kapillarscan erhalten, muss ein SD-Test durchgeführt werden. Dieser kann Aufschluss über die Gründe des Fluoreszenzverlustes geben. Mit freundlicher Genehmigung von NanoTemper Technologies.

Gibt es beim Kapillarscan nur ein geringes Signal-Rausch-Verhältnis, so deutet dies auf eine zu geringe Konzentration des fluoreszenzmarkierten Bindungspartners hin. Dies kann ebenfalls aufgrund von Adsorptionsreaktionen passieren oder auf Probleme beim Markierungsprozess des Proteins hinweisen. Zunächst kann die LED-Power, welche zur Anregung des Fluoreszenzmoleküls dient, auf bis zu 95 % hochgestellt werden. Sollte die Fluoreszenzintensität nun zwischen 200 und 1500 Counts liegen, kann mit der MST-Messung fortgefahren werden. Ist dies nicht der Fall, muss auch hier eine Optimierung der Assaykonditionen oder des Markierungsprozesses erfolgen, z. B. Veränderungen der Pufferzusammensetzungen oder Markierungsmethode. Liegen die Counts hingegen über 1500 oder sind die Peaks sogar abgeschnitten (> 2500 Counts), sollte auf freien Fluoreszenzfarbstoff in der Probe getestet werden.

In den Rohdaten lassen sich sowohl Aggregation als auch Denaturierung der MST-Messung erkennen. In diesem Fall zeigen die MST-Kurven Beulen und Wellen oder variieren sehr stark untereinander (s. Abb. 23) [156].

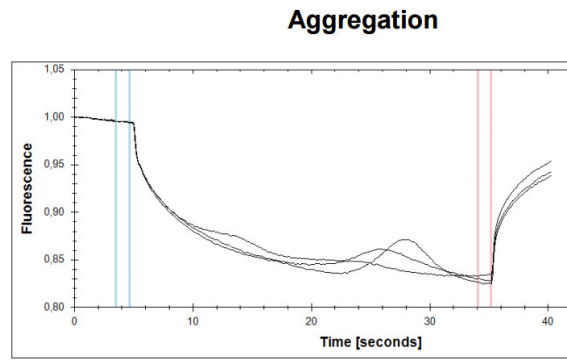


Abb. 23 Aggregation in MST-Kurven:

Beispielhafte Darstellung der MST-Kurven mit Beulen und Wellen, welche auf eine Aggregation der Probe hindeuten oder auf eine Denaturierung der Proteine. Solche Kurven können nicht für die Auswertung herangezogen werden, sondern müssen aus den Messungen entfernt werden, wenn es vereinzelte Punkte betrifft. Mit freundlicher Genehmigung von NanoTemper Technologies.

Um dieses Problem zu beseitigen, können Detergenzien wie Tween20 oder Proteine wie BSA im Assay eingesetzt werden. In einigen Fällen reicht es aus, den Puffer zu optimieren, z. B. indem der pH-Wert oder die Zusammensetzung verändert wird, oder die Proben bei ca. 15000 x g für 5 Minuten zu zentrifugieren [156].

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Materialien, Geräte und EDV-Systeme

4.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in höchster Reinheit bei folgenden Herstellern erworben: Sigma-Aldrich, Merck, Carl Roth, GE Healthcare, Fermentas, NEB, Fluka.

Tab. 2 Enzyme und Kits

Bezeichnung	Hersteller
Bam HI (10 U/μl) mit Tango Puffer verwendet	Thermo Fisher Scientific, St. Leon Rot, Deutschland
Nhe I (10 U/μl) Tango Puffer verwendet	Thermo Fisher Scientific, St. Leon Rot, Deutschland
Phusion DNA Polymerase mit 5x Phusion HF Puffer verwendet	Thermo Fisher Scientific, St. Leon Rot, Deutschland
Pst I (10 U/μl) mit Puffer O verwendet	Thermo Fisher Scientific, St. Leon Rot, Deutschland
T4 DNA Ligase (5 U/μl) mit T4 DNA Ligase Puffer verwendet	Thermo Fisher Scientific, St. Leon Rot, Deutschland
Gibson Assembly® Cloning Kit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
GeneJET PCR Purification Kit #K0702	Thermo Fisher Scientific, St. Leon Rot, Deutschland
Midiprep NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Deutschland

Tab. 3 Zellkulturmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, life technologies, Dreireich, Deutschland; Pan Biotech, Aidenback, Deutschland
Fetal calf serum (FCS)	Gibco, life technologies, Dreireich, Deutschland; Pan Biotech, Aidenback, Deutschland
Lipofectamine® 2000 Transfektionsreagenz	Invitrogen, life technologies, Dreireich, Deutschland
DPBS	Gibco, life technologies, Dreireich, Deutschland
100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin(PenStrep)	Gibco, life technologies, Dreireich, Deutschland; Pan Biotech, Aidenback, Deutschland
Puromycin-dihydrochloride	Gold Biotechnology, St. Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA 0,05%	Gibco, life technologies, Dreireich, Deutschland

Tab. 4 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Mouse anti-Strep-tag II antibody	Iba, Göttingen, Deutschland
Polyclonal rabbit anti-mouse IgG antibody coupled to horseradish peroxidase	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
Casein Kinase II α (1AD9): sc-12738	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
Casein Kinase II β (6D5): sc-12739	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA

Tab. 5 Sonstige Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Super Signal West Dura	Thermo Fisher Scientific, St. Leon Rot, Deutschland
SOC Outgrowth Media #B90209	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
4x Laemmli Probenpuffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

4.2 Materialien, Geräte und EDV-Systeme

Tab. 6 Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Zentrifugen	
5415 D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
5430R	
5424	
RC 3B Plus und RC 5B Plus	Sorvall, Newton, CT, US
Autoklaven	
Variklav Typ 400, Dampfsterilisator	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Waagen	
SC 2 Feinwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
KERN 770 Analysenwaage	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland
Chromatographie	
ÄKTA Explorer	GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland
Assay	
Synergy™ 2 multimode microplate reader	BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland
Nanotemper Monolith NT.115	Nanotemper, München, Deutschland
Sonstige Geräte	
BIO-RAD Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
HydroFlex microplate washer	Tecan Group Ltd. , Männedorf, Schweiz
Inkubationsschüttler	Infors HT, Einsbach, Deutschland
Mastercycler personal	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
T100 ThermoCycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
NanoDrop 2000c spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, St. Leon Rot, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
ThermoMixer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Metrohm 827 pH lab pH-Meter	Metrohm, Herisau, Schweiz
Methrom 6.0258.600 pH-Elektrode	Metrohm, Herisau, Schweiz
Eppendorf Pipetten "References" and "Research plus"	Eppendorf, Hamburg Deutschland
DistriMan Stepper	Gilson Inc., Middleton, UK
membraPure, distillery	membraPure, Bodenheim, Deutschland
Sterilbänke	
Sterilbank Lamin Air HB2448	Thermo Fisher Scientific, St. Leon Rot, Deutschland
Steril Werkbank Gelaire Flow Laboratories BSB 4A	Gelaire, Sydney, Australien
UV-Tische	
3UV-Transilluminator mit ProAlpha Digi Doc und Power Shot A640	Genetic Technologies, Inc., Miami, FL, USA
UVIvue Transilluminator BTS-26-LM	UVItec Limited, Cambridge, UK
Schüttler HT Infors TypAII70	Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Tab. 7 Verwendete Materialien

Name	Hersteller
Zellkultur	
175 cm ² BD Falcon Zellkulturflasche	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
175 cm ² Nunclon Delta Surface Triplezellkulturflasche	Thermo Fisher Scientific, St. Leon Rot, Deutschland
75 cm ² BD Falcon Zellkulturflasche	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
Chromatographie	
1 + 5 mL Hi-Trap Heparin Affinitätschromatographie Säule	GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland
P11 Cellulose Säule	Whatmann, Kent, UK
HisTrap HP Säule	GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland
Strep-Tactin® Superflow® 50% suspension	Iba, Göttingen, Germany
Assay	
Nunc-Immuno MicroWell 96 well solid plate (F96 MaxiSorp)	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark

Name	Hersteller
Schwarze <i>BRAND</i> plates®, 96-well Platten mit F-Boden	Brand, Wertheim, Deutschland
Monolith™ NT.115 Standard Treated Capillaries	Nanotemper, München, Deutschland
Monolith™ Protein Labeling Kit RED-NHS (Amine Reactive)	Nanotemper, München, Deutschland
Sonstige Materialien	
Hybond-C Extra	Amersham, GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland
Kodak Biomax X-ray film	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Amicon Ultra, Zentrifugenfilter, Ultracel-30K, regenerierte Zellulose 30.000	Millipore, Carrigtwowhill Co. Cork, Irland
0,22 µM Sterilfilter (Typ GPWP)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

4.2.1 Verwendete EDV-Systeme

Tab. 8 Verwendete EDV-Geräte

Programm	Entwickler, Referenz
Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
GraphPad Prism 7	GraphPad Software Inc. La Jolla, USA
Gen5 Microplate Reader and Imager Software	BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland
MO.Control	Nanotemper, München, Deutschland
MO.Affinity Analysis	Nanotemper, München, Deutschland
Programm	Entwickler, Referenz
Alpha Pro View	Genetic Technologies, Inc., Miami, FL, USA
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems Incorporated, San José, CA, USA
Unicorn 5.3.1	GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland

4.3 Verwendete Puffer und Lösungen

Tab. 9 Verwendete Puffer und Zusammensetzung

Bezeichnung	Zusammensetzung
10x TBS	500 mM Tris , 1,5 M NaCl, pH 7,4
Boratpuffer	Borat, 5x Borat 250 mM, pH 8,5
10x PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O, 2 mM KH ₂ HPO ₄ , pH 7,2-7,8
5x SDS-Laufpuffer	Tris 30 g/L, Glycin 150 g/L, SDS 20% 5 g/L oder 50 ml 10%-ige SDS-Lösung, pH 8,3
Peptidfärbelösung für SDS-PAGE-Gele	0,02% (w/v). Coomassie blue G [Serva Blau G], 5% (w/v). Aluminiumsulfat-(14-18)-hydrat, 10% (v/v) Ethanol 96%, 2% (v/v) Phosphorsäure 100%
10x TBE	1 M Tris, 1 M Borsäure, 0,02 M EDTA
LB-Medium (Platten)	5 g Trypton oder Pepton 2,5 g Hefeextrakt 5 g NaCl (+7,5 g Agar)
TE Puffer	10 mM Tris, 1 mM EDTA
Puffer A (Aufreinigung)	300 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 8,5
Puffer B (Aufreinigung)	1 M NaCl, 25 mM Tris, pH 8,5
ITC-Puffer	500 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 8,5
P1 (Plasmidpräparation)	50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase, pH 8,0
P2 (Plasmidpräparation)	200 mM NaOH, 1% SDS
P3 (Plasmidpräparation)	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
50x TAE	2 M Tris Acetat, 0,05 M EDTA, pH 8,2 - 8,4
Waschpuffer- Affinitätschromatographie mit EDTA	100 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
Destain-Lösung	10% (v/v) Ethanol 96% 2% (v/v) Phosphorsäure 100%

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F- endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rK- ,mK+) supE44 relA1 (80D lacZΔM15) Δ(lacZYA argF)U169	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden [162]
<i>E. coli</i> DH5α	F- endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK- ,mK+) supE44 relA1 (Φ80D lacZΔM15) Δ(lacZYA-argF)U169	Invitrogen, Carlsbad, USA [163]
<i>E. coli</i> NEB5α	fhuA2 (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 80 (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland [164]

4.4.2 Oligonucleotide

Die für die molekularbiologischen Arbeiten verwendeten Oligonucleotide sind in Tab. 10 (PCR zur Klonierung) und Tab. 11 (Sequenzierung) mit den jeweiligen Sequenzen aufgeführt

Tab. 10 Oligonucleotide und ihre Sequenzen für die Klonierung.

Primer	Sequenz
p53 fwd CK2α	AAAGCTAGCATCGGGACCCGTGCCAAGCAG
p54 rev CK2α fl	AAAGGATCCTCGCTGAGCGCCAGCGGC
p55 rev CK2α s	AAAGGATCCACCCATTCGAGCCTGGTCCTTC
p56 fwd CK2β	AAAGCTAGCAAGCAGCTCAGAGGAGGTGTC
p57 rev CK2β fl	AAACTCGAGGCGAATCGTCTTGACTGGGCTCTTG
p58 rev CK2β s	AAACTCGAGATGGATCTTGAAACCGTAG
p67 fwd CK2α Gibson	AGGGCTCTGGCAGCCCCGCTAGCATCGGGACCCGT GCCAAG
p68 rev CK2α s Gibson	GAGCCGCGAGGAACCAGGGATCCACCCATTCGAGC CTGGTC
p76 rev CK2α fl Gibson	GAGCCGCGAGGAACCAGGGATCCCTGCTGAGCGCC A
p88 fwd CK2β Gibson	AGGGCTCTGGCAGCCCCGCTAGCAAGCAGCTCAGA GGAGGTG
p84 rev CKβ s Gibson	GAGCCGCGAGGAACCAGGGATCCATGGATCTTGAA ACCGTAGAGC

Primer	Sequenz
p85 rev CK β fl Gibson	GAGCCGCGAGGAACCAGGGATCCGCGAATCGTCTT GACTGG
fwd CK2 α' C336S Gibson	GGAGGGCTCTGGCAGCCCCGCTAGCcACCCGGCCC GGCCGCGGG
rev CK2 α' C336S Gibson	CAGAGCCGCGAGGAACCAGGGATCCTCGTGCTGCC GTGAGACCACTGGAAAGCACAGC

Tab. 11 Oligonucleotide und ihre Sequenzen für die Sequenzierung.

Primer	Sequenz
pCEP	AGCTCGTTTAGTGAACCGTCAG
pCEP rev	TCATCAATGTATCTTATCATGTCT
p59 CK2 β 1	AGCAGGTCCCTCACTACCG
p60 CK2 β 2	AGACATCCCAGGTGAAGCCA
p61 CK2 β 3	CAGTTCGAGAAAGGTGGAGG
p62 CK2 α 1	GTTGCGAAAATTAGGCCGAGGT
p63 CK2 α 2	ATTATTGTCACAGCATGGGAA
p64 CK2 α 3	TCAGTTGGTGAGGATAGCCAA

4.4.3 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen *in vitro*. Die Kettenreaktion beruht darauf, dass in jedem Zyklus die Produkte der vorherigen Reaktion wieder als Ausgangsmaterial dienen. Die Vervielfältigung der DNA-Sequenz steigt somit mit jedem Zyklus exponentiell an. Ausgehend von zwei Oligonucleotiden (Primern), welche die zu amplifizierende Sequenz von beiden Seiten begrenzen, kann mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase die gewünschte Nucleotidsequenz kopiert werden. Dabei findet zunächst in jedem Zyklus eine Hitzedenaturierung zur Bildung von einzelsträngiger DNA statt. Darauf folgt das Binden der Primer (Primer-Annealing). Zur Verdopplung der DNA-Sequenz wird nun durch die Polymerase wieder ein Doppelstrang zwischen den beiden Primern aufgebaut (Primer Extension) [165].

Die PCR-Ansätze setzen sich folgendermaßen zusammen:

10 µl 5 x Phusion HF buffer
 1 µl forward Primer (25 µM)
 1 µl reverse Primer (25 µM)
 1 µl dNTPs (10 mM)
 5 µl DMSO (10 %)
 0,5 µl Phusion DNA-polymerase
 0,5 µl DNA-Template (10 ng)
 31 µl H₂O

Bei dem verwendeten PCR-Programm handelt es sich um ein 2-Step-Protokoll, das heißt, die Annealings- und Extensionsschritte sind miteinander kombiniert. Der gesamte Zyklus, bestehend aus den Schritten Denaturierung, Annealing und Extension, wurde insgesamt 32 Mal durchgeführt. Zuletzt erfolgt eine 10-minütige(s. Tab. 12).

Tab. 12 PCR-Programm für die Amplifikation von DNA.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	
Denaturierung	98 °C	30 s	
Annealing und Extension	72 °C	20 s (CK2β-Konstrukte) 30 s (CK2α-Konstrukte)	32 Zyklen
Finale Verlängerung	72 °C	10 min	

4.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese beruht auf dem Prinzip, geladene Moleküle mit Hilfe eines elektrischen Feldes nach ihrer Größe zu trennen. Hierzu wird eine Gelmatrix elektrisch aufgeladen, und die Moleküle werden während der Migration zur Anode aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung und Größe voneinander separiert [166]. DNA-Fragmente besitzen ein negativ geladenes Zucker-Phosphatgerüst und stellen deswegen Polyanionen dar. Das Verhältnis zwischen Größe und Ladung der DNA-Fragmente ist dabei konstant. Dadurch ergibt sich auch über einen weiten Größenbereich ein linearer Zusammenhang zwischen der Fragmentlänge (in Basenpaaren) und der Wanderungsdistanz (in cm, bezogen auf die Gesamtstrecke). Diese Methode wurde während der molekularbiologischen Arbeiten sowohl als präparatives Mittel nach der PCR als auch für analytische Zwecke nach dem

Restriktionsverdau der Plasmidpräparation genutzt. Für beide Varianten wurden Agarosegele mit 1 % (w/v) Agarose in TBE-Puffer hergestellt. Dafür wurden 0,7 g Agarose eingewogen, in 70 ml TBE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle bis zum vollständigen Lösen der Agarose aufgekocht. Der TBE-Puffer wurde ebenfalls als Laufpuffer für die Gelelektrophorese verwendet. Um eine Näherungsquantifizierung der aufgetragenen Proben zu garantieren, wurde die GeneRuler-1-kb-DNA-Leiter (4 µl) jedem Gel hinzugefügt. Den Proben wurde je ein Sechstel ihres Gesamtvolumens 6x DNA Loading Dye hinzugefügt. Dieses enthält neben Glycerin, welches ein Absinken der Proben in die Probentaschen sicherstellt, die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol FF. Diese dienen der zweifarbigen Visualisierung der DNA-Migration während der Gelelektrophorese. Für die Durchführung wurde eine Spannung von 100 V an die Laufkammer angeschlossen und so lange beibehalten, bis eine ausreichende Migration und damit Auftrennung der DNA sichergestellt war. Anschließend wurden die Gele in 0,1 % Ethidiumbromid in TBE-Puffer für 30 min bei 60 °C inkubiert. Ethidiumbromid ist ein roter Phenanthridin-Farbstoff, welcher zwischen einzelne Basen der DNA interkaliert. Hierdurch verändert sich das Anregungsspektrum, und die Fluoreszenz in UV-B-Licht wird verstärkt, so dass mit Hilfe eines UV-Transilluminators die Proben sichtbar gemacht werden können [167]. Bei präparativen Gelen wurden die entsprechenden Banden mit Hilfe eines Skalpell herausgeschnitten und mit dem GeneJet Gel Extraction Kit von Thermo Fisher Scientific nach Anleitung des Herstellers aufgearbeitet. Analytische Gele wurden photographisch dokumentiert.

4.4.5 Restriktionsverdau nach PCR

Zur Klonierung der Konstrukte von CK2β¹⁻¹⁹³ und CK2β wurden die gereinigten PCR-Produkte zunächst mit den Restriktionsenzymen NheI und XhoI geschnitten, um im nachfolgenden Schritt in den Zielvektor ligiert zu werden. Der Reaktionsansatz des Restriktionsverdaus lautet wie folgt:

10 µl PCR-Produkt (400 ng Template)

4 µl Tango 10 x Puffer gelb

1 µl NheI

25 µl H₂O

Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, und anschließend erfolgte die Zugabe von:

6 µl Tango 10x Puffer gelb

1 µl XhoI

3 µl H₂O

Daraufhin wurde erneut für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und der Reaktionsansatz anschließend mit dem Kit der Firma Fermentas nach Anleitung aufgearbeitet. Dazu wurde der

Restriktionsansatz 1:1 mit Binding Buffer versetzt und auf eine DNA Purification Micro Column aus dem Kit gegeben. Das Ganze wurde für 1 min bei 13000 rpm (5415 D, Eppendorf) zentrifugiert und der Durchfluss anschließend verworfen. Darauffolgend wurden 700 µl Waschpuffer auf die Micro Column gegeben und erneut für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Micro Column wurde dann in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt, und 30 µl Elution Buffer wurden in die Mitte der Säule pipettiert. Diese wurde für 1 min bei Raumtemperatur belassen und anschließend erneut für 1 min bei 13000 rpm (5415 D, Eppendorf) zentrifugiert. Zum Schluss wurde die Konzentration der Elution für die darauffolgende Ligation am Nanodrop bestimmt.

4.4.6 Restriktionsverdau des Vektors pV152 zur Ligation

Zur Klonierung von CK2α¹⁻³³⁵, CK2α und CK2α^{C336S} wurde der Vektor pV152 mit den Restriktionsenzymen NheI und BamHI verdaut. Zur Klonierung von CK2β¹⁻¹⁹³ und CK2β wurde der Vektor pV152 mit den Restriktionsenzymen NheI und XhoI geschnitten. Dazu wurden die folgenden Reaktionsansätze verwendet:

6 µl Vektor

3 µl Tango 10x Puffer gelb

2 µl NheI

19 µl H₂O

Dieser wurde zunächst für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde dem Reaktionsansatz folgendes hinzugefügt:

5 µl Tange 10x Puffer gelb

2 µl BamHI/XhoI

3 µl H₂O

Der Reaktionsansatz wurde erneut für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend mit dem GeneJET PCR Purification Kit aufgearbeitet.

Der Reaktionsansatz wurde weiter ebenso, wie unter 3.3.4 beschrieben, behandelt.

4.4.7 Ligation

Zur Bestimmung der für die Ligation benötigten Konzentrationen des Vektors und der dazugehörigen PCR-Produkte wurde folgende Formel verwendet

$$i = \frac{s_i \cdot t}{\left(\frac{s_v}{riv}\right) + s_i} \quad \text{Gl. 26}$$

i = Menge Insert

s_i = Größe Insert (bp)

t = Menge Gesamt (200 ng)

s_v = Größe Vektor (bp)

riv = Ratio Insert/Vektor (5)

Der Ligationsansatz enthielt zudem 1 µl Ligase-T4 und 1 µl 10x Ligase-Puffer. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug immer 10 µl, fehlende Volumina nach entsprechendem Einsatz von Vektor und Insert wurden mit Aqua dest. aufgefüllt. Die Ligationsansätze wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Ligase bei 65 °C für 10 min inaktiviert, und der Ansatz konnte zur Transformation (s. Kapitel 4.4.9 und 4.4.10) weiterverwendet werden.

4.4.8 Gibson Assembly Reaktion

Das Gibson Assembly Kit beruht auf einer Einzelreaktion zur Zusammenführung von überlappenden DNA-Stücken, bei welcher simultan drei Enzyme arbeiten. Dieses Kit vereint die Aktivität einer 5'-Exonuklease, einer Polymerase und einer Ligase. Dabei sorgt die 5'-Exonuklease für einen Abbau am 5'-Ende der Sequenzen, so dass die komplementären Sequenzen zur Anlagerung aneinander zur Verfügung stehen. Die Polymerase sorgt dann dafür, dass die Lücken in den angelagerten Regionen wieder aufgefüllt werden. Abschließend wird durch die Aktivität der Ligase die DNA wieder kovalent miteinander verknüpft. Das Reaktionsschema ist in Abb. 24 zu sehen [168,169].

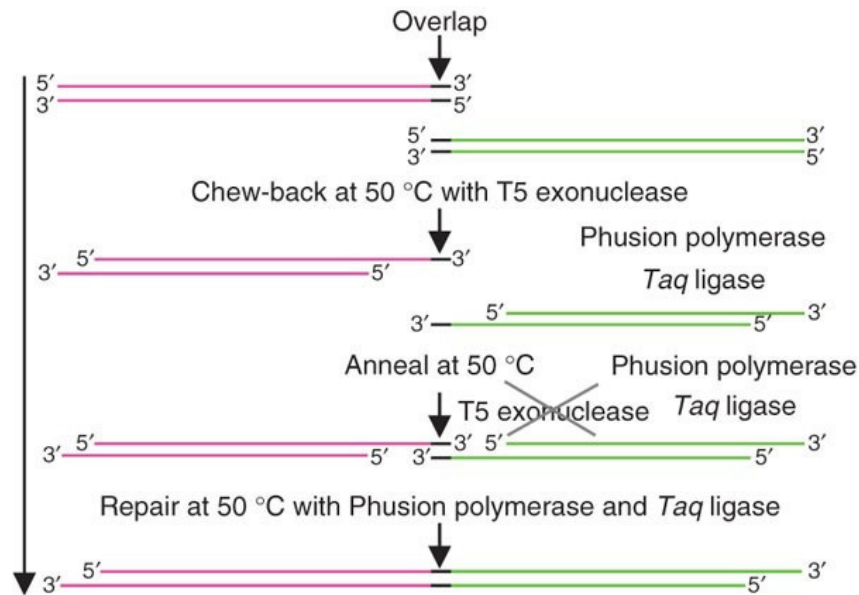


Abb. 24 Schematische Darstellung der Reaktionen des Gibson Assembly Kits:

Die Abbildung zeigt die einzelnen Reaktionen der drei simultan arbeitenden Enzyme. Entnommen aus Gibson *et al.* [169] Mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group.

Für diese Methode der Klonierung werden nur für die PCR-Reaktion, welche zuvor durchgeführt werden muss, spezielle Primer benötigt. Diese Primer besitzen sowohl mit dem Vektor-Backbone als auch mit dem DNA-Insert mindestens 18 überlappende Basenpaare. Der Vektor muss vor der Nutzung des Kits zunächst mit Hilfe von Restriktionsenzymen linearisiert werden. Außerdem muss eine PCR-Reaktion mit den designten Primern und dem Insert, wie unter 3.3.2 beschrieben, durchgeführt werden.

Durchgeführt wurde die Gibson-Assembly-Reaktion nach Anleitung des Herstellers. Hierzu wurden 25–100 ng des Vektors und ein mindestens 2-facher Überschuss an Insert eingesetzt. Pro Reaktion wurde ein Gesamtvolumen von 20 µl verwendet. Dabei werden 10 µl des Gibson-Assembly-Master-Mixes (2x) und sowohl 2–10 µl an PCR-Fragmenten als auch an linearisiertem Vektor benötigt. Um in jedem Fall auf 20 µl Gesamtvolumen zu kommen, wurde fehlendes Restvolumen mit Aqua dest. aufgefüllt. Der gesamte Ansatz wurde für 15 min bei 50 °C inkubiert und anschließend auf Eis oder bei –20 °C gelagert.

4.4.9 Transformation von elektrokompenten *E. coli*-Zellen

Es wurden 50 µl Aliquots der elektrokompenten *E. coli* DH10B auf Eis aufgetaut. Zu den aufgetauten Bakterien wurden je 2 µl des Ligationsansatzes gegeben und das Ganze für 1 Minute auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde der gesamte Ansatz in eine Elektroporationskuvette gegeben. Diese wurde in den Elektroporator platziert und der Ansatz einem Strompuls (250 Ω, 25 µFD, 1,6 V) ausgesetzt. Nach einem Signalton wurde die Kuvette entnommen, 1 ml SOC-Medium in die Kuvette gegeben, alles mit einer Pipette gemischt und

danach in ein steriles Reagenzglas überführt. Die Reagenzgläser wurden für 1 h bei 37 °C und 200 rpm (Inkubationsschüttler, Infors HT) inkubiert. Schließlich wurden die Bakterienkulturen bei 13000 rpm (5415 D, Eppendorf) für 1 min zentrifugiert und 700 µl des Überstandes entfernt. Die Pellets wurden im restlichen Medium resuspendiert und je 150 µl auf LB-Platten, die 100 µg/ml Ampicillin enthielten, mit Hilfe eines Drigalski-Spatels ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert [163].

4.4.10 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

Ein Aliquot der kompetenten *E. coli* NEB5alpha aus dem Gibson Assembly Cloning Kit wurde auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 2 µl des Produktes aus der vorherigen Gibson–Assembly-Reaktion hinzugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Mischung wurde für 30 min auf Eis gestellt. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 s, und das Reaktionsgefäß wurde erneut für 2 min auf Eis gestellt. In das Reaktionsgefäß wurden daraufhin 950 µl auf Raumtemperatur gebrachtes SOC-Medium gegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 °C und 200 rpm (Inkubationsschüttler, Infors HT) inkubiert. 100 µl der Bakterienkultur wurden auf eine LB-Platte mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert [163].

4.4.11 Plasmidpräparation im 1,5-ml-Maßstab

In der Regel wurden 8 Kolonien der transformierten *E. coli* DH10B oder NEB5alpha gepickt, wobei etwas von der Bakterienkultur auf eine neue LB-Platte mit 100 µg/ml Ampicillin aufgetragen und der Rest jeweils in ein steriles Reagenzglas mit 2 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin überführt wurde. Die Kulturen im Reagenzglas und die neu bestrichene LB-Platte (Sicherheitsplatte) wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, wobei die Inkubation der Bakterienkulturen im Reagenzglas unter Schütteln bei 200 rpm (Inkubationsschüttler, Infors HT) stattfand. Am darauffolgenden Tag wurden 1,5 ml der Kulturen in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt, für 1 min bei 13000 rpm (5415 D, Eppendorf) zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Zu den Pellets wurden 200 µl des Puffers P1 gegeben und diese darin resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl des Puffers P2 hinzugefügt, der Ansatz mit Hilfe einer Pipette gemischt und für 2 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 200 µl des Puffers P3 hinzugegeben und die Ansätze für 3 min bei 13000 rpm (5415 D, Eppendorf) zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, in frische 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und die DNA mit 350 µl 100 % Isopropanol gefällt. Die Reaktionsgefäße wurden 20 min bei 4 °C bei 13000 rpm (5415 D, Eppendorf) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das so erhaltene DNA-Pellet wurde mit 200 µl 70%-Ethanol gewaschen und bei 65 °C im Thermoblock getrocknet. Zum Schluss wurde das Pellet in 30 µl Aqua Dest. gelöst und die DNA-Konzentration am Nanodrop bestimmt.

Um nach der Plasmidpräparation eine Aussage über den Erfolg der zuvor erfolgten Ligation bzw. der Gibson-Assembly Reaktion treffen zu können, wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Für die Restriktionsanalyse wurden je nach Insert unterschiedliche Restriktionsenzyme (PstI für CK2 β ¹⁻¹⁹³ und CK2 α ^{C336S}; EcoRV für CK2 α ¹⁻³³⁵, CK2 α) verwendet, welche die Anforderung erfüllten, im jeweiligen Insert zu schneiden. So konnten religierte und positive Plasmide durch eine anschließende Kontrolle mittels eines Agarosegels unterschieden werden.

4.4.12 Plasmidpräparation im 200-ml-Maßstab

Für die Plasmidpräparation im 200-ml-Maßstab wurde eine Kolonie ausgewählt, welche bei der Restriktionsanalyse ein positives Ergebnis für die Ligation von Insert und Vektor gezeigt hat. Mit Hilfe einer Impföse wurde etwas von der jeweiligen Kolonie von der Sicherheitsplatte aufgenommen und 200 ml LB-Medium, welches 100 µg/ml Ampicillin enthielt, mit der ausgewählten Kolonie angeimpft. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm (Inkubationsschüttler, Infors HT) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die gesamte Kultur in einen 500-ml-Zentrifugenbecher überführt und bei 7000 rpm (RC 3B Plus, Sorvall) für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Plasmidpräparation erfolgte mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit von Macherey-Nagel. Dabei wurde eine alkalische Lyse nach Anleitung des Herstellers durchgeführt und die DNA mit Hilfe der mitgelieferten Säulen gereinigt. Die DNA wurde nach der Elution mit 100 % Isopropanol gefällt, mit 70%-Ethanol gewaschen und zuletzt in 150 µl TE-Puffer gelöst.

4.4.13 Sequenzierung

Für eine Sequenzierung im Cologne Center for Genomics (CCG) musste zunächst eine PCR durchgeführt werden, um die zu analysierende DNA zu vervielfältigen und einen Fluoreszenzfarbstoff einzubauen. Hierfür wurden je Konstrukt verschiedene Primer eingesetzt, da mit nur einem nicht das vollständige Insert überprüft werden konnte. Der Grund dafür ist, dass das Insert zu lang ist und in der Regel nur 400–500 Basen je Primer sequenziert werden können. Das Pipettierschema für je einen Primer ist in Tab. 13 zu finden.

Tab. 13 Pipettierschema für die PCR zur Sequenzierung.

Komponente	Menge (µl)
H ₂ O	4,9
5x Puffer	2,5
DNA	1,0
Primer (2 µM)	1,25
Big Dye 1.1 (1:5 verdünnt)	1,25

Zu beachten war, das Big Dye erst nach einer initialen Denaturierung für 5 min bei 94 °C dem Reaktionsansatz zuzugeben. Danach wurde das folgende PCR-Programm für 32 Zyklen durchgeführt:

Tab. 14 PCR-Programm zur PCR für die Sequenzierung.

Funktion	Zeit	Temperatur
Denaturierung	10 s	96 °C
Annealing	5 s	55 °C
Synthese	4 min	60 °C

Die Proben wurden nach der PCR im CCG abgeben und dort sequenziert. Andere Proben konnten ohne vorherige PCR bei der Firma GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) abgegeben werden. Dazu wurden 20 µl der Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 30–100 ng/µl sowie 20 µl der Primer mit einer Konzentration von 10 pmol/µl benötigt. Die Firma GATC Biotech AG führte dann eine Sanger-Sequenzierung der Proben durch [170].

4.4.14 Transfektion mit Turbofect von CK2α¹⁻³³⁵, CK2α und CK2α^{C336S}

Zur Transfektion von HEK293-EBNA-Zellen mit Turbofect wurden diese am Vortag 1:3 auf 75-cm²-Zellkulturflaschen gesplittet, damit diese am nächsten Tag zu 50–70 % konfluent waren. Am darauffolgenden Tag wurde zunächst der Transfektionskomplex angesetzt. Dieser bestand aus 1200 µl serumfreiem DMEM, welchem 12 µg der DNA und 24 µl der Turbofect-Reagenzlösung hinzupipettiert wurden. Das Ganze wurde für 15 min bei Raumtemperatur belassen, um eine optimale Ausbildung des Transfektionskomplexes zu ermöglichen. In der Zwischenzeit wurde den Zellen 12 ml frisches DMEM-Medium mit 10 % FCS, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin gegeben. Nach Ablauf der 15 min wurde der Transfektionskomplex vorsichtig und tropfenweise zu den Zellen hinzugegeben und das Ganze für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach den 24 h wurde das Nährmedium gegen das Selektionsmedium getauscht, welches zusätzlich 3 µg/ml Puromycin enthielt. Am

nächsten Tag erfolgte erneut ein Wechsel des Mediums, um durch die Selektion abgestorbene Zellen zu entfernen.

Wenn die Zellen ca. 100 % Konfluenz erreicht hatten, wurden sie auf vier 175-cm²-Zellkulturflaschen gesplittet. Wenn diese Flaschen wiederum ungefähr 100 % Konfluenz erreicht hatten, wurden sie auf vier Tripleflaschen gesplittet. Von diesen wurde dann täglich das Medium gesammelt und gegen das neue Medium ausgetauscht. Dabei wurde der Gehalt an Serum von 10 % auf 2 % reduziert, sobald alle drei Böden der Tripleflaschen zu 100 % konfluent bewachsen waren. Das Medium wurde von den Zellen abgenommen und anschließend bei 4 °C und 7000 rpm (RC 3B Plus, Sorvall) für 7 min zentrifugiert. Das Medium wurde über zwei Wochen gesammelt.

4.4.15 Transfektion mit Lipofectamine® 2000 von CK2 β ¹⁻¹⁹³ und CK2 β

Auch zur Transfektion von HEK293-EBNA-Zellen mit Lipofectamine® 2000 wurden diese am Vortag 1:3 auf 75-cm²-Zellkulturflaschen gesplittet. Am nächsten Tag wurden zunächst ca. 20 µg der Plasmid-DNA in 1500 µl serumfreien DMEM-Medium verdünnt. Anschließend wurden ebenfalls 50 µl Lipofectamine®-2000-Reagenz in 1500 µl serumfreiem DMEM-Medium für 5 min inkubiert. Nach Ablauf der 5 min wurden beide Verdünnungen miteinander vereinigt, vorsichtig gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das Medium der Zellen gegen 12 ml frisches Medium mit 10 % FCS sowie 100 IU/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin ausgetauscht. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Transfektionskomplex vorsichtig zu den Zellen pipettiert und durch leichtes Schwenken der Zellkulturflasche mit dem Medium gemischt. Die Zellen wurden für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen 1:10 gesplittet und sowohl die zur Transfektion genutzte Zellkulturflasche als auch die 1:10 gesplittete Zellkulturflasche erneut für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Medium der Zellen wurde nach der weiteren Inkubation gegen das Selektionsmedium, welches zusätzlich 3 µg/ml Puromycin enthielt, ausgetauscht. Am nächsten Tag erfolgte erneut ein Wechsel des Mediums, um durch die Selektion abgestorbene Zellen zu entfernen.

Anschließend wurde mit den Zellen, ähnlich wie unter 3.3.13 beschrieben, verfahren. Es wurde lediglich bei 100 % Konfluenz zunächst eine 75-cm²-Flasche auf eine 175-cm²-Flasche gesplittet. Die 175-cm²-Flasche wurde bei 100 % Konfluenz dann auf drei weitere 175-cm²-Flaschen gesplittet, bis letztendlich neun 175-cm²-Flaschen bei 100 % Konfluenz auf je eine Tripleflasche gesplittet wurden. Das Sammeln des Mediums erfolgte, wie unter 4.4.14 beschrieben.

4.5 Proteinbiochemische Methoden

4.5.1 Affinitätschromatographie mit Streptactin-Sepharose

Die mit Hilfe des Vektors in HEK293-EBNA-Zellen exprimierten Proteine wurden aufgrund des starken Signalpeptids in das Zellkulturmedium sekretiert. Das über einen Zeitraum von zwei Wochen gesammelte Medium wurde über eine selbstgebaute Säule mit einem Säulenvolumen von etwa 0,5 ml Streptactin Superflow High Capacity Sepharose gegeben. Das Medium wurde mit Hilfe einer Peristaltikpumpe mit einer Flussrate von ca. 0,25 ml/min auf die Säule aufgetragen. Wenn etwa 500–1000 ml des Mediums über die Säule gelaufen waren, wurde diese zunächst so lange mit Affinitätswaschpuffer gewaschen, bis die Säule wieder komplett farblos war. Anschließend wurde mit 8–10 ml Affinitätswaschpuffer, welcher 5 mM Desthiobiotin enthielt, eluiert. Um die Säule erneut zur Aufreinigung von Medium verwenden zu können, wurde sie nach der Elution mit Affinitätswaschpuffer, welches 1 mM 2-(4'-Hydroxyphenylazo)-Benzoessäure (HABA) enthielt, gewaschen. Dies geschah so lange, bis das Säulenmaterial eine orangene Farbe annahm. Anschließend wurde die Säule mit Affinitätswaschpuffer wieder ausgewaschen. Das Proteineluat wurde mit Hilfe eines Amicon® Ultra 15 ml gepoolt und umgepuffert (ITC-Puffer). Zuletzt wurde die Konzentration am Nanodrop bestimmt und das gelöste Protein bei -80 °C im Kühlschrank eingefroren.

4.5.2 Rekombinante Expression von CK2α¹⁻³³⁵, CK2α^{C336S} und CK2β¹⁻¹⁹³ im 5-l-

Maßstab in *E. coli*

Für die Expression im 5-l-Maßstab wurden mit Hilfe von Glycerolstocks von bereits transformierten *E. coli* BL21 (DE3) zwei Übernachtskulturen mit 50 ml LB-Amp-Medium (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) angeimpft. Diese wurden bei 37 °C und 200 rpm (Inkubationsschüttler, Infors HT) inkubiert. Am nächsten Tag wurden je 10 ml dieser Übernachtskulturen zu 8 Erlenmeyerkolben mit je 600 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gegeben und erneut bei 37 °C und 200 rpm (Inkubationsschüttler, Infors HT) inkubiert. Die Bakterien wuchsen so lange, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,6–0,8 erreichten. Daraufhin wurde die Proteinexpression induziert. Hierzu wurde IPTG in einer finalen Konzentration von 0,5 mM zu jeder Kultur pipettiert. Die Kulturen wurden für weitere 3 h bei 37 °C im Schüttler bei 200 rpm (Inkubationsschüttler, Infors HT) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, das heißt, sie wurden für 10 min bei 7000 rpm (RC 3B Plus, Sorvall) und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Bakterienpellets wurden mit 200 ml eiskalter Waschlösung mit 0,9 % NaCl und 0,2 mM PMSF gewaschen, resuspendiert und erneut für 10 min bei 7000 rpm (RC 3B Plus, Sorvall) und 4 °C zentrifugiert. Zuletzt wurden die Bakterienpellets so vereinigt, dass 3 Stück übrig blieben. Diese wurden erneut zentrifugiert und zum Schluss bei -80 °C eingefroren.

4.5.3 Rekombinante Expression von CK2 β ¹⁻¹⁹³ mit N-terminalem Doppel-Streptag-II im 2-I-Maßstab

Für die Expression im 2-I-Maßstab wurden zwei Übernachtskulturen mit 50 ml LB-Amp-Medium mit Hilfe eines Glycerolstocks transformierter *E. coli* BL21 (DE3), welche den Expressionsvektor enthalten, angeimpft. Die Übernachtskulturen wurden bei 37 °C und 200 rpm (Inkubationsschüttler, Infors HT) bis zum nächsten Morgen inkubiert. Mit Hilfe der beiden Übernachtskulturen wurden am darauffolgenden Tag zwei 1-I-Kulturen angeimpft und diese erneut bei 37 °C und 200 rpm (Inkubationsschüttler, Infors HT) inkubiert. Das Wachstum der Bakterienkulturen wurde beobachtet, bis diese eine OD₆₀₀ von 0,6–0,8 erreichten. Daraufhin wurde mittels der Zugabe von IPTG mit einer finalen Konzentration von 0,5 mM die Proteinexpression induziert und die Bakterien für weitere 3 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Bakterienkulturen für 10 min bei 7000 rpm (RC 3B Plus, Sorvall) und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Die Pellets wurden mit je 150 ml eiskalter Waschlösung (0,9 % NaCl; 0,2 mM PMSF) gewaschen, resuspendiert und erneut für 10 min bei 7000 rpm (RC 3B Plus, Sorvall) und 4 °C zentrifugiert. Zuletzt wurden beide Pellets vereinigt und bei –80 °C weggefroren.

4.5.4 Lyse von Bakterien der rekombinanten Expression im 5-I-Maßstab

Für die Lyse wurden 2 Pellets auf Eis aufgetaut. Nachdem die Pellets aufgetaut waren, wurden sie in 40 ml Lyse-Puffer (25 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8,5) gelöst. Dem Lyse-Puffer wurden zuvor 1 ml 40 mg/ml Lysozyme und 40 µl DNase mit einer Konzentration von 10 mg/ml zugefügt. Die Resuspension erfolgte mit Hilfe eines Enzymspatels sowie eines Vortexmischers. Sobald die Pellets vollständig resuspendiert waren, wurden sie für 30 min auf Eis belassen. Anschließend wurden die Zellen per Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurde insgesamt 1 min sonifiziert bei einer Amplitude von 40 % mit einem sich abwechselnden Intervall von 2 s Sonifikation und 2 s Kühlen. Um Zelltrümmer nach dem Zellaufschluss zu entfernen, wurde die Zelllösung für 30 min bei 20000 rpm (RC 5B Plus, Sorvall) zentrifugiert. Der Überstand wurde abschließend noch einmal zusätzlich über ein Filterpapier gegeben, um auch letzte Reste der Zelltrümmer für die weitere Reinigung zu entfernen. Der so gefilterte Überstand wurde sofort für weitere Reinigungsschritte verwendet.

4.5.5 Lyse von Bakterien der rekombinanten Expression im 2-I-Maßstab

Für die Lyse nach der Expression im 2-I-Maßstab wurde das Bakterienpellet auf Eis aufgetaut. Nachdem das Pellet aufgetaut war, wurde es in 15 ml Lyse-Puffer (25 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8,5) resuspendiert. Dem Ansatz wurde 1 ml Lysozym mit einer Konzentration von 2 mg/ml hinzugefügt sowie 26 µl DNase mit einer Konzentration von 1 mg/ml. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min auf Eis belassen. Darauf folgte ein Aufschluss per Ultraschall. Dazu wurde

insgesamt 5 min sonifiziert mit einer Amplitude von 80 % und einem sich abwechselnden Intervall von 2 s Sonifikation und 2 s Kühlen. Nach dem Aufschluss wurden die Zelltrümmer abgetrennt. Dazu wurde 45 min bei 7830 rpm zentrifugiert (RC 5B Plus, Sorvall T) und anschließend noch einmal zusätzlich über einen Faltenfilter filtriert. Der Durchfluss wurde für die weitere Reinigung verwendet.

4.5.6 Kationenaustausch-/Affinitätschromatographie mit P11-Cellulose im Batch-

Verfahren

Diese Aufreinigung im Batch-Verfahren wurde für CK2 α^{1-335} , welche in *E. coli* exprimiert wurde, sowie CK2 α und CK2 α^{1-335} , die in HEK293-EBNA-Zellen exprimiert wurden, verwendet. Bei dem Phospho-Cellulose-Material handelt es sich um einen bifunktionellen Kationenaustauscher. Dieser besitzt schwache und starke Säuregruppen, welche über funktionelle Ortho-Phosphoester verknüpft sind. Diese Methode wird zur Separierung von Biopolymeren sowie Enzymen genutzt, welche ATP-abhängige Wechselwirkungen katalysieren, z. B. Proteinkinasen, Restriktionsenzyme, Nucleasen und Polymerasen. Im Fall der CK2 α -Konstrukte handelt es sich deswegen um eine Affinitätschromatographie.

Zu Beginn jeder Aufreinigung wurde das Säulenmaterial zunächst je zweimal mit Wasser sowie Puffer B (1 M NaCl, 25 mM Tris, pH 8,5) und anschließend dreimal mit Puffer A (300 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 8,5) äquilibriert. Diese drei Schritte wurden in einem 50-ml-Falcon durchgeführt, welches immer komplett mit Puffer aufgefüllt wurde. Anschließend wurde das Säulenmaterial entweder mit dem Überstand der Lyse der Bakterien oder dem gesammelten Medium der HEK293-EBNA-Zellen für mindestens 1 h bei 4 °C auf dem Rotator inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand bei 4 °C und 5000 rpm (5430R, Eppendorf) für 30 min zentrifugiert und abdekantiert. Darauf folgten drei Waschschrte, bei denen die Falcons jeweils mit 50 ml Puffer A aufgefüllt wurden und jedes Mal bei 4 °C und 5000 rpm für 15 min abzentrifugiert wurde. Zur Elution des Proteins wurden 15 ml Puffer B zur P11-Cellulose gegeben und für 30 min bei 4 °C auf dem Rotator inkubiert. Das Eluat wurde bei 5000 rpm und 4 °C für 15 min abzentrifugiert, anschließend aufkonzentriert und in ITC-Puffer (500 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 8,5) umgepuffert. Es erfolgte eine zweite Elution über Nacht bei 4 °C auf dem Rotator. Auch diese wurde mit einem Amicon® Ultra 15 ml aufkonzentriert und in ITC-Puffer umgepuffert.

4.5.7 Affinitätschromatographie mit Heparin

Für die weitere Aufreinigung nach der Chromatographie mit P11-Cellulose bzw. teilweise nach der Affinitätschromatographie mit Streptactin wurde eine Affinitätschromatographie mit Heparin durchgeführt. Hierzu wurde eine Heparinsäule (HiTrap Heparin HP, 1 ml oder 5 ml) verwendet, welche mit Puffer A (300 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 8,5) äquilibriert wurde. Die

Proteinproben des ersten Reinigungsschrittes (P11 oder Streptactin) wurden mittels eines Amicon® Ultra 15 auf ein Volumen von ca. 1 ml eingengt und dabei gleichzeitig die Pufferkomposition so geändert, dass die NaCl-Konzentration unter 300 mM lag. Die Probe wurde mittels des ÄKTA-Chromatographiesystems über einen 1-ml-Loop und eine Flussrate von 0,3 ml/min auf die Säule aufgetragen, bzw. das Bakterienlysate wurde direkt mit einem Supperloop aufgetragen. Mittels eines linearen Salzgradienten, ansteigend von 300 mM NaCl bis zu einer Endkonzentration von 1 M NaCl, wurden die Proteine eluiert, die Proteinpeaks gesammelt und vereinigt. Abschließend wurden die Proben in ITC-Puffer umgepuffert.

4.5.8 NiNTA-Affinitätschromatographie

Die in *E. coli* mit einem Polyhistidin-Tag (His-tag) exprimierte *hsCK2α*^{C336S} interagiert spezifisch mit dem Säulenmaterial der NiNTA-Säule (HisTrap, 5 ml) und kann so beispielsweise aus einer komplexen Lösung, wie dem Zelllysate von Bakterien, isoliert werden. Bevor das Bakterienlysate aufgetragen wurde, wurde die Säule zunächst mit Niedrig-Imidazolpuffer (50 mM Hepes, pH 7,5, 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol, 5 % (v/v) Glycerol, 0,5 mM TCEP) äquilibriert. Anschließend wurde mittels eines Superloops das Bakterienlysate auf die Säule aufgetragen. Bis zu einer gleichbleibenden Absorption bei 280 nm wurde die Säule zunächst weiter mit Niedrig-Imidazolpuffer gewaschen. Darauf folgte die Elution des Proteins. Hierfür wurde, ähnlich wie bei der Affinitätschromatographie mit Heparin, ein linearer Gradient von 10 mM Imidazol bis zum Erreichen der Imidazolkonzentration des Hoch-Imidazolpuffers (50 mM Hepes, pH 7,5, 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol, 5 % (v/v) Glycerol, 0,5 mM TCEP) von 250 mM Imidazol verwendet. Er wurde über 10 Säulenvolumen mit einer Flussrate von 1 ml/min gefahren. Die Fraktionen mit Protein wurden vereinigt und mit Hilfe eines Amicon® Ultra 15 in ITC-Puffer umgepuffert und aufkonzentriert.

4.6 Proteinanalytische Methoden

4.6.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung der Konzentration der Proteinproben wurde die direkte Absorption bei 280 nm mit dem NanoDrop 2000 UV-VIS Spectrophotometer gemessen. Dazu wurde die molare Masse in kDa sowie der Extinktionskoeffizient des jeweiligen Proteins benötigt. Mittels der Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins wurden diese Parameter mit Hilfe der Internetseite ExPASy und dem dort vorhanden Tool ProtParam berechnet. [171]

4.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Analyse von Proteinen im elektrischen Feld. Hierbei werden die Proteine nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Für die SDS-PAGE wurde ein 10 % Acrylamid/Bisacrylamid Trenngel (s. Tab. 15) und ein

4 % Acrylamid/Bisacrylamid Sammelgel (s. Tab. 16) gegossen. Die Zusammensetzung für zwei Gele war dabei folgendermaßen:

Tab. 15 Zusammensetzung Trenngel

Substanz	Volumen
Acrylamid	2,5 ml
Tris/HCl 3 M	2,5 ml
10 % SDS	100 µl
Wasser	4,9 ml
APS	100 µl
TEMED	10 µl

Tab. 16 Zusammensetzung Sammelgel

Substanz	Volumen
Acrylamid	0,4 ml
Tris/HCl 0,5 M	1,04 ml
10 % SDS	40 µl
Wasser	2,52 ml
APS	100 µl
TEMED	10 µl

Die zu analysierenden Proteine wurden mit ITC-Puffer auf eine Konzentration von 100 µM gebracht. 12 µl der Proteinprobe wurden mit 4 µl des Probenpuffers versetzt und für 5 min bei 95 °C im Thermomix inkubiert. Die Proben wurden vollständig auf das SDS-Gel aufgetragen, und zusätzlich wurde als Größenstandard 4 µl einer Prestained Protein Ladder aufgetragen. Die Elektrophoresekammer wurde bis zur Markierung mit Laufpuffer gefüllt. Die Trennung folgte anschließend für 1,5 h bei 120 V. Zur Detektion wurden die Gele mit Coomassie-Lösung über Nacht eingefärbt und anschließend mit Destain-Lösung entfärbt.

4.6.3 Western-Blot

Bei der Western-Blot-Analyse wurden die zu analysieren Proteine von der SDS-Page auf eine Nitrocellulose-Membran per Elektrophorese übertragen, um sie mittels Immundetektion nachzuweisen. Dazu wurde ein Sandwich-Verfahren im Tank genutzt. Die Nitrocellulose-Membran wurde zunächst für 10 s in Methanol, 5 min in Wasser und 10 min in Transferpuffer (20 % Methanol, Boratpuffer) behandelt.

Anschließend konnte das Sandwich für den Transfer wie folgt gebaut werden:

Kathode

Schwamm

2–3 Filterpapiere

SDS-Gel

Membran

2–3 Filterpapiere

Schwamm

Anode

Die Elektrophoresekammer wurde auf einem Magnetrührer platziert und mit einem Magnetrührfisch sowie einem Kühlakku versehen. Anschließend wurde die Blotting-Kammer eingesetzt und die Elektrophoresekammer bis zur Markierung mit Transferpuffer gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur bei 300 mA. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran markiert, um zu wissen, auf welcher Seite sich die geblotteten Proteine befinden. Anschließend folgte ein Blockierungsschritt der freien Bindungsstellen der Membran mit 5 % Magermilchpulver in 1x TBS, welcher entweder über Nacht bei 4 °C oder für 1 h bei Raumtemperatur erfolgte. Nach der Blockierung wurde die Membran dreimal mit TBS-T für je 5 min gewaschen. Darauf folgte die Inkubation der Membran mit dem jeweiligen Primär-Antikörper (Anti-*hsCk2α*, Anti-*hsCk2β*, Anti-Strep-Tag). Dieser wurde 1:500 in TBS verdünnt und die Membran damit für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut je dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Zuletzt wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit 1:1000 Sekundär-Antikörper (Rabbit-anti-mouse) in TBS-T inkubiert. Nach einer h Inkubation erfolgte ein letzter Waschschrift mit je dreimal TBS-T für 5 min. Die Detektion erfolgte mittels des Sekundär-Antikörpers, welcher mit Meerrettichperoxidase (Horseradisch Peroxidase, HRP) konjugiert ist. Die Detektionslösung enthält chemilumineszente Substrate der HRP. Dafür wird eine Zwei-Komponenten-Detektionslösung verwendet, welche kurz vor der Detektion im Verhältnis 1:1 gemischt und anschließend auf die Membran gegeben wird. Die Inkubationszeit der Detektionslösung betrug 5 min. Anschließend wurden die nachzuweisenden Proteine mit Hilfe von Fotoplatten detektiert.

4.6.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Um die Proteine nachzuweisen, wurde die Methode des ELISA sowohl für die *hsCk2α*_{HEK}, *hsCk2α*¹⁻³³⁵_{HEK} und *hsCk2α*^{C336S}_{HEK} als auch für *hsCk2β*¹⁻¹⁹³_{HEK} aus HEK293-EBNA-Zellen für den Nachweis der Proteine eingesetzt. Hierzu wurden die Bindungseigenschaften von polyklonalem Maus-Anti-CK2α- und -CK2β-Antikörpern gegen das jeweilige Protein und

polyklonalem Maus-Anti-Strep-Tag-Antikörper gegen beide Proteine untersucht. Welche Konzentrationen und Positivkontrollen genau eingesetzt wurden, kann Tab. 17 und Tab. 18 entnommen werden.

Tab. 17 Proteine und ihre Konzentration im ELISA

Protein	Konzentration	Antikörper
<i>hsCK2β</i> ¹⁻¹⁹³ _{HEK}	50 µg/ml	Anti-CK2β
CK2β ¹⁻¹⁹³ (<i>E. coli</i>)	50 µg/ml	Anti-CK2β (Positivkontrolle)
<i>hsCK2β</i> ¹⁻¹⁹³ _{HEK}	10 µg/ml	Anti-Strep-Tag
mCEase (HEK)	50 µg/ml	Anti-Strep-Tag (Positivkontrolle)

Tab. 18 Proteine und ihre Konzentration im ELISA

Protein	Konzentration	Antikörper
<i>hsCK2α</i> _{HEK}	65 µg/ml	Anti-CK2α
<i>hsCK2α</i> ¹⁻³³⁵ _{HEK}	50,6 µg/ml	Anti-CK2α
<i>hsCK2α</i> ^{C336S} _{HEK}	51,1 µg/ml	Anti-CK2α
CK2α ¹⁻³³⁵ (<i>E. coli</i>)	51,9 µg/ml	Anti-CK2α (Positivkontrolle)
<i>hsCK2α</i> _{HEK}	65 µg/ml	Anti-Strep-Tag
<i>hsCK2α</i> ¹⁻³³⁵ _{HEK}	50,6 µg/ml	Anti-Strep-Tag
<i>hsCK2α</i> ^{C336S} _{HEK}	51,1 µg/ml	Anti-Strep-Tag
mCEase (HEK)	50 µg/ml	Anti-Strep-Tag (Positivkontrolle)

NuncImmuno-MicroWell-96-Well-Platten aus Polystyren wurden über Nacht bei Raumtemperatur mit den Proteinen beschichtet. Nach der Beschichtung erfolgten drei Waschschrte mit 0,05 % Tween 20 in TBS mit Hilfe eines HydroFlex-Mikroplatten-Washer. Im zweiten Reaktionsschritt wurden freie Bindungsstellen mit Hilfe von 1 % bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS für 1,5 h bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurde erneut dreimal mit Hilfe des HydroFlex-Mikroplatten-Washers. und 0,05 % Tween 20 in TBS gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit dem jeweils ersten Antikörper Anti-CK2α, Anti-CK2β oder Anti-Strep-Tag. Es wurde für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert und danach erneut dreimal mit 0,05 % Tween 20 in TBS gewaschen. Im letzten Inkubationsschritt wurde ein Anti-Maus-IgG-Antikörper, welcher mit Meerrettichperoxidase (Horseradisch Peroxidase, HRP) konjugiert war, verwendet. Nach 1,5 h Inkubationszeit und einem Waschschrte mit 0,05 % Tween 20 in TBS und zwei weiteren mit destilliertem Wasser konnte die Detektion der Peroxidaseaktivität erfolgen. Diese wurde mit Hilfe einer Substratlösung mit Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidinen durchgeführt. Nach Zugabe der Substratlösung verfärbt sich der Ansatz im Well blau. Nach 15 Minuten wird die

Reaktion durch Zugabe von 10%iger Schwefelsäure gestoppt, und der Ansatz verfärbt sich gelb. Die Absorption aller Wells wurde spektrophotometrisch bei 450 nm mit Hilfe eines Mikroplattenreader (Synergy™ 2, BioTek) ermittelt. Die weitere Auswertung erfolgte mittels Excel 2010 (Microsoft Corporation) und GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software). Es erfolgte je eine Messung in Triplikaten.

4.7 Peptidsynthese

4.7.1 Automatisierte Festphasensynthese von Peptiden mittels Roboter

Die Peptidsynthese von Pc sowie Ahx-Pc erfolgte mittels eines Syntheseroboters am Wang-Harz. Dazu wurde je Ansatz 50 mg des zuvor beladenen Gly-Wang-Harzes eingesetzt, aus welchem sich eine Beladungsdichte von 33 μmol ergab. In einem ersten Schritt wurde das Harz für 10 min in 800 μl DMF vorgequollen. Als Nächstes wurde die Fmoc-Schutzgruppen mittels 30 % Piperidin in DMF entfernt. Diese Mischung wurde dann zweimal für 10 min auf dem Harz belassen. Anschließend wurden durch viermaliges Waschen mit 600 μl DMF das Piperidin und die Fmoc-Moleküle von dem Harz entfernt. Danach erfolgte der nächste Kupplungsschritt. Für diesen Schritt wurden alle benötigten Aminosäuren in DMF gelöst, so dass sie eine finale Konzentration von 0,4 M hatten. Eine Ausnahme bildete dabei Phenylalanin, welches in N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) gelöst wurde. Für die Kupplung wurde ein 4-facher Überschuss gegenüber dem Wang-Harz eingesetzt (4 Äquivalente). Die Kupplungsreagenzien DIC und Oxyma wurden jeweils zu 2,4 M in DMF gelöst. Beide wurden im siebenfachen Überschuss eingesetzt (7 Äquivalente). Für die Kupplung wurden vom Roboter 300 μl der entsprechenden Aminosäure sowie 50 μl Oxyma zum Harz pipettiert und für 2 min inkubiert, bevor die Zugabe von 50 μl DIC erfolgte. Im Anschluss an die Zugabe folgte eine 40-minütige Reaktionszeit, nach welcher das Harz mit 800 μl DMF gewaschen wurde und die Kupplung erneut wiederholt wurde. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe sowie die Aminosäurekupplung wurden so lange wiederholt, bis das gewünschte Peptid erhalten wurde. Zum Schluss wurde das Harz noch zweimal mit je 800 μl DMF gewaschen.

4.7.2 Kupplung von Sarcosin

Für die Kupplung von Sarcosin wurde das Harz nach der Robotersynthese für 15 min mit 1 ml DMF vorgequollen. Das Fmoc-geschützte Sarcosin (66 μmol , 2 Äquivalente), HATU (66 μmol , 2 Äquivalente) und 5,7 μl DIPEA (33 μmol , 1 Äquivalent) wurden in der Zwischenzeit in 300 μl DMF gelöst und anschließend zu dem vorgequollenen Harz pipettiert. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 2 h geschüttelt. Anschließend wurde das Harz je fünfmal mit den Lösemitteln DMF, Dichlormethan, Methanol und Ethanol gewaschen. Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Kupplung wurde ein Kaisertest (s. Kapitel 4.8.1) durchgeführt. Fiel dieser

positiv aus, so wurde die Kupplung wiederholt. Fiel er hingegen negativ aus, wurde eine Probeabspaltung durchgeführt.

4.7.3 Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe per Hand wurde das Harz für 15 min in DMF vorgequollen. Für die eigentliche Abspaltung wurde zweimal 500 µl einer 30%igen Piperidinlösung in DMF zum Harz pipettiert und dieses für 20 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler belassen. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

4.7.4 Markierung mit Carboxyfluorescein

Zur Markierung mit 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) wurde das Harz 15 min in DMF vorgequollen. Anschließend wurden HATU und CF (49,5 µmol, 1,5 Äquivalente) zusammen mit 8,5 µl DIPEA (49,5 µmol, 1,5 Äquivalente) in 300 µl DMF gelöst. Das Gemisch wurde dann vollständig zum vorgequollenen Harz gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Dabei wurde der Ansatz aufgrund des Fluoreszenzmoleküls vor Licht geschützt. Anschließend wurde das Harz je fünfmal mit den folgenden Lösemitteln gewaschen: DMF, Dichlormethan, Methanol und Ethanol. Nach dem Waschen wurde der gesamte Ansatz für 10 min in der SpeedVac getrocknet. Um eine Vollständigkeit der CF-Markierung zu gewährleisten, wurde ein Kaisertest (s. Kapitel 4.8.1) zur Überprüfung durchgeführt. War die Markierung vollständig, wurde eine Polymerabspaltung durchgeführt, um CF-Polymere zu vermeiden. Dazu wurde das Harz erneut 15 min mit DMF vorgequollen. Anschließend wurde 1 ml einer 20%igen Piperidinlösung in DMF zugegeben und der Ansatz für 45 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Abschließend wurde erneut fünfmal mit DMF, Dichlormethan, Methanol und Ethanol gewaschen und das Harz für 10 min in der SpeedVac getrocknet.

4.7.5 Markierung mit Rhodamin B

Zur Markierung mit Rhodamin B wurde das Harz 15 min mit 1 ml DMF vorgequollen. Gleichzeitig wurden Rhodamin (66 µmol, 2 Äquivalente) in 400 µl DMF gelöst und DIPEA (122 µmol, 4 Äquivalente) und HATU (66 µmol, 2 Äquivalente) hinzugegeben und das Gemisch für 15 min bei Raumtemperatur voraktiviert. Das Gemisch aus Rhodamin B, DIPEA und HATU wurde anschließend zum vorgequollenen Harz pipettiert und 5 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Ansatz wurde dabei vor Licht geschützt. Anschließend wurde der Ansatz je fünfmal mit DMF, Dichlormethan, Methanol und Ethanol gewaschen und das Harz für 10 min in der SpeedVac getrocknet. Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Kupplung wurde ein Kaisertest (s. Kapitel 4.8.1.) durchgeführt.

4.7.6 Probeabspaltung

Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Peptidsynthese wurde eine Probeabspaltung durchgeführt. Dazu wurden einige Harzkügelchen des jeweiligen Ansatzes entnommen und in ein 1,5-ml-Reagiergefäß gegeben. Zu diesen wurden 10 µl eines Scavengergemisches pipettiert. Die Scavengermischung bestand aus 7 µl Thioanisol und 3 µl 1,2-Ethandithiol. Zuletzt wurden 90 µl TFA zu dem Ansatz gegeben, und der Reaktionsansatz wurde für 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach der 3-stündigen Inkubationszeit wurde das Peptid mittels 1 ml eiskaltem Diethylether gefällt und für 30–60 min bei –20 °C in den Gefrierschrank gestellt. Darauf wurde für 4 min bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand danach verworfen. Das Peptid wurde in 1 ml eiskaltem Diethylether resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der ganze Waschvorgang wurde insgesamt fünfmal wiederholt und der Niederschlag für 10 min in der SpeedVac getrocknet. Der getrocknete Niederschlag wurde in 100 µl eines Wasser-t-BuOH-Gemisches (3:1) gelöst. Für die HPLC-ESI-MS wurde eine Probe vorbereitet. Dazu wurde 1 µl des gelösten Peptids zu 49 µl einer 10 % Acetonitril mit 0,1 % TFA gegeben.

4.7.7 Vollabspaltung

Für die Vollabspaltung wurden 100 µl einer Scavengermischung zu dem Harz gegeben. Dieses Gemisch bestand aus 70 µl Thioanisol und 30 µl 1,2-Ethandithiol. Darauf wurden 900 µl TFA zu dem Harz pipettiert. Der Ansatz wurde für 3 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler belassen. Das Peptid wurde daraufhin mit 10 ml eiskaltem Diethylether ausgefällt und das Harz nochmals mit 200 µl TFA gewaschen. Die 200 µl TFA, welche zum Waschen verwendet wurden, wurden ebenfalls zu dem Diethylether gegeben. Der gesamte Ansatz wurde für 30 min bei –20 °C im Gefrierschrank gelagert. Anschließend wurde für 5 min bei 4 °C mit 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde in 10 ml eiskaltem Diethylether resuspendiert und erneut für 5 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde insgesamt fünfmal wiederholt. Daraufhin wurde der Niederschlag für 10 min in der SpeedVac getrocknet und danach in 3 ml eines Wasser-t-BuOH-Gemisches (3:1) gelöst. Davon wurde 1 µl als Probe für die HPLC-ESI-MS mit 49 µl 10 % Acetonitril mit 0,1 % TFA gemischt. Der restliche Ansatz wurde in einem tarierten Pillengläschen lyophilisiert.

4.7.8 Zyklisierung der Peptide mittels Wasserstoffperoxid

Für die Zyklisierung über die beiden im Endbereich befindlichen Cysteine wurden 5 mg des gereinigten Peptides in 10 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer (pH 8,0) gelöst, so dass eine Endkonzentration von 50 µM vorlag. Dem Ansatz wurde so viel 30%iges H₂O₂ hinzugefügt, dass die Endkonzentration hiervon 3 % betrug. Anschließend wurde der Ansatz ohne Deckel für genau 45 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Zuletzt wurde der Reaktionsansatz mit Hilfe

von TFA angesäuert, um eine Überoxidierung zu vermeiden. Der Ansatz wurde per Festphasenextraktion gereinigt.

4.7.9 Festphasenextraktion

Für die Festphasenextraktion zur Reinigung der zyklisierten Peptide wurde eine Chromafix-SPE-Kartusche der Firma Macherey-Nagel verwendet. Der erste Schritt der Reinigung bestand darin, die Säule mit 10 ml Acetonitril mit 0,1 % TFA zu konditionieren. Danach wurde mit 10 ml Wasser mit 0,1 % TFA äquilibriert. Nach der Äquilibrierung konnte die Peptidlösung der Zyklisierungsreaktion auf die Säule aufgetragen werden. Anschließend folgte ein Waschschriff mit 10 ml 10%-Acetonitril mit 0,1 % TFA. Danach wurde das Peptid mit 5 ml 60%-Acetonitril mit 0,1 % TFA und zusätzlich 5 ml Acetonitril mit 0,1 % TFA eluiert. Das Eluat wurde zunächst mit Hilfe des Xcel-Vap-Verdampfers eingengt und anschließend in einem tarierten Pillengläschen lyophilisiert.

4.7.10 Reinigung der Peptide durch RP-HPLC

Zur Reinigung der zyklisierten Peptide wurde eine präparative RP-HPLC (C18-Säule) durchgeführt. Dazu wurden die Laufmittel A (H₂O mit 0,1 % TFA) und B (Acetonitril mit 0,1% TFA) verwendet. Es wurden zwei unterschiedliche lineare Gradienten mit einer Fließgeschwindigkeit von 6 ml/min verwendet.

1. 10–60 % B in A in 4 min
2. 10–40 % B in A in 45 min

Zur Detektion der einzelnen Peaks wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 220 nm gemessen, und die verschiedenen Peaks wurden in Fraktionen aufgefangen. Die Eluate wurden anschließend mit Hilfe des Xcel-Vap-Verdampfers eingengt und je 30 µl für die weitere Analytik mittels HPLC-ESI-MS entnommen. Alle Fraktionen, welche das Peptid in einer ausreichenden Reinheit enthielten, wurden vereinigt und in einem tarierten Pillengläschen lyophilisiert.

4.8 Peptidanalytik

4.8.1 Kaisertest

Zur Prüfung der Vollständigkeit einer Aminosäurekupplung bzw. einer Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff wurde der Kaisertest verwendet. Dieser wurde von *Emil Kaiser* eingeführt und kann qualitativ die An- und Abwesenheit freier primärer Aminogruppen nachweisen [172]. Er beruht, chemisch gesehen, auf der Ninhydrin-Probe und besteht aus drei Lösungen:

Lösung 1: 1,0 g Ninhydrin in 10 ml Ethanol

Lösung 2: 80g Phenol in 20 ml Ethanol

Lösung 3: 0,4 ml wässrige Kaliumcyanid-Lösung (1 mM) in 20 ml Pyridin

Wenn noch freie primäre Aminogruppen vorliegen, gehen diese eine Reaktion ein, welche am Ende über einen Farbumschlag nachgewiesen wird. Der Reaktionsmechanismus der Ninhydrin Probe ist in Abb. 25 dargestellt.

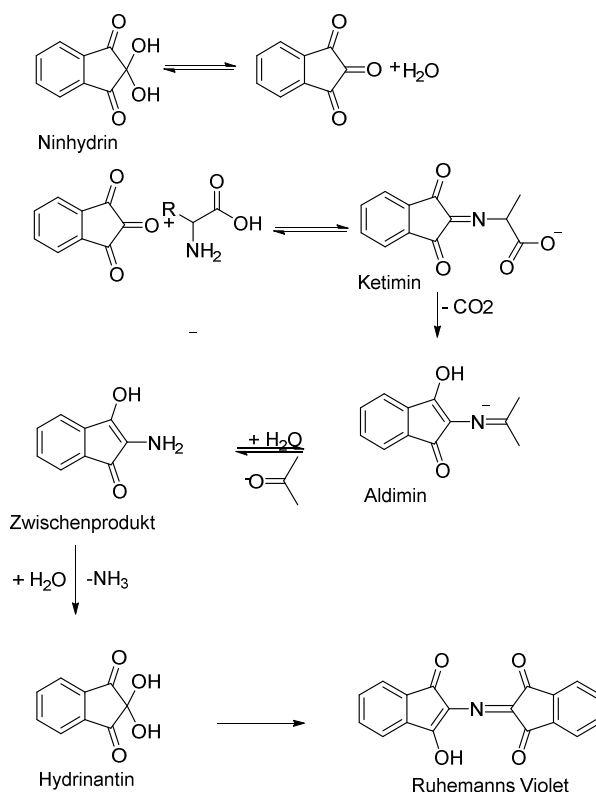


Abb. 25 Reaktionsschema Kaisertest:

Reaktionsgleichungen für die Reaktion von freien primären Aminogruppen mit Ninhydrin zum Ruhemanns-Violett. Mit der Reaktion soll überprüft werden, ob die Aminosäurekupplung vollständig ist.

Für die Durchführung wurden wenige Harzkugeln dem jeweiligen Ansatz entnommen und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß gegeben. Zu den Harzkügelchen wurden dann je zwei Tropfen der drei Reaktionslösungen gegeben und das Reaktionsgefäß für 5 min bei 95 °C in den Thermomixer gestellt. Als Negativkontrolle wurden die drei Reaktionslösungen in ein leeres Reaktionsgefäß gegeben. Zur Positivkontrolle wurde eine an der Seitenkette Z-geschützte Aminosäure gewählt. Positiv- sowie Negativkontrolle wurden ebenfalls für 5 min bei 95 °C in den Thermomixer gestellt. Zeigte die Probe die gleiche Gelbfärbung wie die Negativkontrolle, konnte die Kupplung als vollständig angesehen werden. Kam es jedoch zu einer violetten bis blauen Färbung der Lösung, die auf der Bildung des Ruhemanns-Purpur beruht, lagen weiterhin freie Aminogruppen vor, und die Kupplung musste wiederholt werden.

4.8.2 RP-HPLC gekoppelt mit ESI-MS

Die Detektion bei der HPLC-ESI-MS (High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation Massspectroscopie) erfolgt gekoppelt über einen UV-Detektor und ein ESI-MS. So ist es möglich, die nach der HPLC erhaltenen Peaks einer entsprechenden molaren Masse zuzuordnen. Mit Hilfe der HPLC und einer C-18-Säule, die als stationäre Phase dient, kann die Reinheit und Retentionszeit der Peptide ermittelt werden. Hierbei werden, wie bereits, bei der präparativen RP-HPLC die Laufmittel A (H_2O mit 0,1 % TFA) und B (Acetonitril mit 0,08 % TFA) verwendet. Dabei wurde mit einem linearen Gradienten von 10–60 % B in A in 15 min und einer Flussrate von 0,6 ml/min gearbeitet. Das am Ende erhaltene Eluat wurde im Verhältnis 1:9 gesplittet. 8 Teile wurden dabei zur Messung am UV-Detektor bei 220 nm verwendet und 1 Teil für die Detektion durch die ESI-MS. Bei der Methode der ESI-MS wird die Probe durch eine feine Metallkapillare geleitet, bei welcher an der Spitze eine Spannung angelegt ist. Durch die angelegte Spannung entsteht ein elektrisches Feld, welches die Peptide in der Probe ionisiert. In diesem Fall war eine positive Spannung angelegt, welche dafür sorgt, dass positiv geladene Ionen entstehen. Diese sind je nach Menge der angelagerten Protonen einfach oder mehrfach positiv geladen. Bei der ESI-MS wird zunächst immer ein Scan über den gesamten Massenbereich von 100–2000 m/z durchgeführt. Darauf folgt ein Scan des intensivsten Peaks zur genaueren Aufklärung.

4.9 Fluoreszenz-Anisotropie-Assay

Für das Screening nach neuen Substanzen, welche die Bindung der CK2-Untereinheiten CK2 α und CK2 β inhibieren und somit die Formation des CK2-Holoenzym stören könnte, wurde ein Fluoreszenz-Anisotropie (FA)-Assay entwickelt. Hierzu wurde das Pc-Peptid, welches in der Literatur bereits als Inhibitor der CK2 α /CK2 β -Bindung beschrieben wurde, mit CF über 6-Aminohexansäure als Linker fluoreszenzmarkiert. Die Messungen wurden alle mit einem Mikroplattenreader (SynergyTM 2, BioTek) durchgeführt und BRANDplates-pureGrade-96-Well-Mikrotiterplatten mit F-Boden (Brand, Wertheim, Deutschland) verwendet. Alle Messungen wurden mit einem Gesamtvolumen von 200 μl und bei 37 °C durchgeführt, wobei der DMSO-Gehalt maximal 2 % (v/v) betrug. Der verwendete Assaypuffer enthält 500 mM NaCl und 25 mM Tris mit einem pH-Wert von 8,5. Gemessen wurden die parallele (I_{\parallel}) und perpendikuläre (I_{\perp}) Fluoreszenzintensität bei einer Extinktionswellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}} = 485 \text{ nm}$ und einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{\text{Em}} = 528 \text{ nm}$. Zur Korrektur der perpendikulären Fluoreszenzintensität wurde ein von der Software Gen 5 voreingestellter G-Faktor von 0,87 verwendet. Zu Beginn der Assayentwicklung wurde eine Messung ohne Inkubationszeit und eine nach 50 min Inkubationszeit durchgeführt. Alle Messungen wurden jeweils in An- und Abwesenheit von CF-Ahx-Pc dreimal in Duplikaten bzw. Triplikaten vorgenommen. Die verwendete CK2 α^{1-335} wurde in *E. coli* exprimiert und vor der Messung eine 30- μM -

Stammlösung in Assaypuffer hergestellt. Alle anderen Verdünnungen (CF-AHX-Pc, Inhibitoren) wurden ebenfalls in Assaypuffer vorgenommen. Die Messungen wurden durch Zugabe von CK2 α^{1-335} gestartet. Die Auswertung aller Messungen erfolgte mit Excel 2010 (*Microsoft Corporation*) und GraphPad Prism 5.03 (*GraphPad Software*).

4.9.1 K_D -Wert Bestimmung

Im ersten Schritt wurde der K_D -Wert des fluoreszenzmarkierten Peptids CF-Ahx-Pc bestimmt. Dazu wurde die Konzentration von CF-Ahx-Pc konstant bei 100 nM gehalten und 9 verschiedene Konzentrationen der CK2 α^{1-335} verwendet. Die verschiedenen CK2 α^{1-335} -Konzentrationen wurden jeweils in An- und Abwesenheit von CF-Ahx-Pc gemessen. Es wurde zudem ein Maximalwert (CF-Ahx-Pc ohne CK2 α^{1-335}) und ein Nullwert (Assaypuffer) bestimmt. Der K_D -Wert für CF-Ahx-Pc wurde ebenfalls für das paraloge Protein CK2 α^{C336S} ermittelt. Tab. 19 sind die Pipettierschemata und die zugehörigen Konzentrationsbereiche zu entnehmen.

Tab. 19 Pipettierschema für die K_D -Wert Bestimmung von CF-Ahx-Pc

Komponente	Volumen	Stock-Konzentration	Finale Konzentration im Well
Assaypuffer	170–200 μ l	–	–
CK2 α^{1-335}	20 μ l	variabel	0,003–100 μ M
CK2 α^{C336S}	20 μ l	variabel	0,003–100 μ M
CF-Ahx-Pc	10 μ l	1 mM -	100 nM

Die Anisotropie r wurde mit Hilfe von Formel 27 ausgewertet.

$$r = \frac{(I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp})}{(I_{\parallel} + 2G \cdot I_{\perp})} \quad \text{Gl. 27}$$

Für die Auswertung der K_D -Werte wurde anschließend folgende Formel herangezogen:

$$r = r_{free} + \frac{(r_{bound} - r_{free})([E] + [L] + K_D - \sqrt{([E] + [L] + K_D)^2 - 4[E][L]})}{2[L]} \quad \text{Gl. 28}$$

r ist dabei die gemessene Anisotropie, r_{free} die Anisotropie des freien CF-Ahx-Pc und r_{bound} die Anisotropie des CF-Ahx-Pc im Komplex mit CK2 α^{1-335} bzw. CK2 α^{C336S} . $[E]$ steht für die Konzentration von CK2 α^{1-335} bzw. CK2 α^{C336S} und $[L]$ ist die Konzentration des CF-Ahx-Pc.

4.9.2 Inhibitor-Screening

Um die neuen Inhibitoren zu testen, wurde zunächst ein Screening durchgeführt. Hierfür wurden 10 mM Stocks der Inhibitoren eingewogen. Pc-Derivate wurden direkt in Assaypuffer gelöst, andere Inhibitoren in DMSO. Die Inhibitoren wurden in je drei Verdünnungsstufen im

Bereich von 1–100 μM vermessen. Die CK2 α^{1-335} -Konzentration im Well betrug 3 μM , und alle Inhibitoren wurden mit und ohne 100 nM CF-Ahx-Pc getestet. Ausgewertet wurde das Screening, indem der Wert in Abwesenheit eines Inhibitors auf 100 % normalisiert wurde und, davon ausgehend, die prozentuale Hemmung für die drei Inhibitorkonzentrationen berechnet wurde. Das Pipettierschema hierzu ist in Tab. 20 aufgeführt.

Tab. 20 Pipettierschema für das Inhibitor-Screening.

Komponente	Volumen	Stock-Konzentration	Finale Konzentration im Well
Assaypuffer	150–200 μl	–	–
CK2 α^{1-335}	20 μl	30 μM	3 μM
CF-Ahx-Pc	10 μl	2 μM	100 nM
Inhibitor	20 μl	10 mM	1–100 μM

4.9.3 IC₅₀-Bestimmung

Für die Bestimmung der IC₅₀-Werte wurden von denjenigen Inhibitoren, die im Screening eine Hemmung zeigten, 10 Konzentrationen und ein Nullwert ohne Inhibitor getestet. Zusätzlich wurde je Messung ein Maximalwert nur mit 100 nM CF-Ahx-Pc gemessen. Die Konzentration von CK2 α^{1-335} betrug 3 μM im Well. Alle Inhibitorkonzentrationen wurden im Triplikat und in An- und Abwesenheit von 100 nM CF-Ahx-Pc getestet. Alle Messungen wurden mindestens dreimal durchgeführt. Das dazugehörige Pipettierschema ist in Tab. 21 dargestellt. Der IC₅₀-Wert für Pc wurde ebenfalls mit der paralogen Form CK2 α^{C336S} ermittelt. Das zugehörige Pipettierschema dieser Messung ist in Tab. 22 aufgeführt.

Tab. 21 Pipettierschema IC₅₀-Bestimmung mit CK2 α^{1-335} .

Komponente	Volumen	Stock-Konzentration	Finale Konzentration im Well
Assaypuffer	150–200 μl	–	–
CK2 α^{1-335}	20 μl	30 μM	3 μM
CF-Ahx-Pc	10 μl	2 μM	100 nM
Inhibitor	20 μl	1–10 mM	variierend

Tab. 22 Pipettierschema IC₅₀-Bestimmung mit CK2 α^{C336S} .

Komponente	Volumen	Stock-Konzentration	Finale Konzentration im Well
Assaypuffer	150–200 μl	–	–

CK2α ^{C336S}	20 µl	300 µM	30 µM
CF-Ahx-Pc	10 µl	2 µM	100 nM
Pc	20 µl	10 mM	3–30 µM

Die IC₅₀-Werte wurden anschließend mit Hilfe von Formel 29 kalkuliert:

$$r = \frac{(r_{\text{bound}} - r_{\text{free}})[I]^h}{([I]^h + IC_{50}^h)} + r_{\text{free}} \quad \text{Gl. 29}$$

Die meisten Variablen sind die gleichen wie in Gleichung 28. [I] steht in diesem Fall für die Inhibitorkonzentration, und der IC₅₀-Wert ist die Konzentration, bei welcher 50 % des CF-Ahx-Pc verdrängt wurden. h gibt die Steilheit der Kurve wieder. Anschließend wurde nach *Nikolovska-Coleska et al.* der K_i-Wert mit Hilfe der gemessenen IC₅₀-Werte berechnet. [173] *Nikolovska-Coleska et al.* entwickelten eine neue Formel zur Berechnung der K_i-Werte, ausgehend von der von *Cheng und Prusoff* entwickelten folgenden Gleichung:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left(\frac{1 + [L]}{K_D}\right)} \quad \text{Gl. 30}$$

$$K_i = \frac{[I]_{50}}{([L]_{50}/K_D + [P]_0/K_D + 1)} \quad \text{Gl. 31}$$

4.9.4 Bestimmung des Z'-Faktors

Mit Hilfe des Z'-Faktor kann eine Aussage über die Qualität eines Assays in Hinsicht darauf getroffen werden, ob dieser für ein High Throughput Screening (HTS) geeignet ist. Hierzu wurden 3 µM CK2α¹⁻³³⁵ und 100 nM CF-Ahx-Pc in An- und Abwesenheit von 30 µM Pc getestet. Dies diente dazu, die Fluoreszenz-Anisotropie von freiem und vollständig gebundenem CF-Ahx-Pc zu testen. Es wurden je dreimal 48 Wells mit und ohne 30 µM Pc getestet.

Die Auswertung erfolgte mittels folgender Formel:

$$Z' = 1 - \frac{3\sigma_c + 6\sigma_{c-}}{|\mu_c + \mu_{c-}|} \quad \text{Gl. 32}$$

σ_c und σ_{c-} stehen dabei für die Standardabweichung der positiven und negativen Kontrolle. μ_c und μ_{c-} sind die Mittelwerte der positiven und negativen Kontrolle.

4.10 Microscale Thermophorese (MST)

Die Microscale-Thermophorese sollte als weitere Messmethode validiert und eingeführt werden, um zum einen K_D-Werte der in HEK293-EBNA-Zellen exprimierten Proteine zu

bestimmen und weitere CK2 β -kompetitive Substanzen zu finden, welche nicht direkt an die gleiche Bindungsstelle wie Pc binden. Alle Messungen wurden an einem Monolith™ NT.115 Series Instrument (Nanotemper, München) durchgeführt mit Monolith™ NT.115 Standard Treated Capillaries. Für diese Zwecke wurde CK2 β^{1-193} in *E. coli* exprimiert und mittels des Monolith NT™ Protein Labeling Kit RED-NHS der Firma Nanotemper für die MST-Messungen gelabelt. CK2 β wurde in allen Experimenten in einer Konzentration von 20 nM eingesetzt. Alle Lösungen wurden in 250- μ l-Reaktionsgefäßen angesetzt, um möglichst wenig Oberfläche zur Adsorption zu bieten. Die Einstellungen für die Messungen wurden mit Hilfe der MO.Control Software (Nanotemper, München) vorgenommen. Die verwendete MST-Power, die Leistung des IR-Lasers, betrug in allen Experimenten 40 % und die LED-Power, die Leistung der LED zu Anregung des Fluoreszenzmoleküls, 95 %. Die Auswertung der Experimente erfolgte mittels MO.Affinity Analysis Software (Nanotemper, München), Excel 2010 (Microsoft Corporation) und GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software).

4.10.1 Labeling mit NT™ Protein Labeling Kit RED-NHS

Das Labeling wurde gemäß der Angabe im Protokoll des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurde zunächst der Assaypuffer gegen Labeling-Puffer ausgetauscht, da das im Assaypuffer (500 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 8,5) enthaltene Tris als primäres Amin die Reaktion stören kann. Dazu wurde eine Zentrifugensäule dreimal mit Labelingpuffer für je 1 min bei 1500 x g in die Zentrifuge gestellt. Anschließend wurden 100 μ l einer 20- μ M-CK2 β^{1-193} in die Mitte der Säule gegeben und erneut bei 1500 x g für 2 min zentrifugiert.

Anschließend konnte die eigentliche Labelingreaktion durchgeführt werden. Dafür wurde der Fluoreszenzfarbstoff in 30 μ l DMSO gelöst, was einer Konzentration von 470 μ M entspricht. 100 μ l der 20- μ M-CK2 β^{1-193} -Lösung wurden mit 100 μ l des Fluoreszenzfarbstoffes mit einer Konzentration von 60 μ M gemischt und für 30 min im Dunklen bei RT gelagert.

Im letzten Schritt erfolgte eine Größenausschluss-Chromatographie mittels Schwerkraft, um den freien Fluoreszenzfarbstoff vom gelabelten Protein zu trennen. Hierzu wurde die dem Kit beigelegte Säule mit dem Assaypuffer je dreimal gewaschen. Dann wurde das Protein aufgetragen, und nachdem es vollständig eingesickert war, wurden 300 μ l Assaypuffer hinzugegeben. Zuletzt wurde mit 600 μ l des Assaypuffers das markierte Protein eluiert. Hierbei war es wichtig, dass bereits eine visuelle Trennung von freiem und gebundenem Fluoreszenzfarbstoff möglich war.

Die Konzentration des eluierten Proteins wurde am Nanodrop bei 280 nm mit einem Korrekturfaktor von 0,028 ermittelt. Die markierte CK2 β^{1-193} wurde in 10 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.10.2 K_D -Wert Bestimmung

Es wurden zunächst die K_D -Werte für CK2 α^{1-335} und CK2 α^{C336S} aus *E. coli* sowie für hsCK2 α_{HEK} , hsCK2 α^{1-335}_{HEK} und hsCK2 α^{C336S}_{HEK} aus HEK293-EBNA-Zellen bestimmt. Hierzu wurde 40 nM der markierten CK2 β^{1-193} mit 0,1 % Tween 20 mit einem Volumen von 200 μ l angesetzt. Die markierte CK2 β^{1-193} wurde für 5 min bei voller Zentrifugalkraft mit einer Zentrifuge zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde eine serielle Verdünnungsreihe der CK2 α -Varianten hergestellt. Dazu wurden in fünfzehn 250- μ l-Reaktionsgefäßen 10 μ l des Assaypuffers vorgelegt. In einem 16. Reaktionsgefäß wurde die Verdünnung mit der doppelten maximal eingesetzten Konzentration für die Messung am Ende der jeweiligen CK2 α -Variante hergestellt. Die Endkonzentrationen können Tab. 23 entnommen werden. Es wurde eine 1:2 serielle Verdünnungsreihe hergestellt, indem je 10 μ l der vorausgegangenen Verdünnung ins nächste Reaktionsgefäß gegeben wurden. Dem letzten Reaktionsgefäß wurden 10 μ l entnommen, die dann verworfen wurden.

Tab. 23 Konzentrationsbereiche der im MST getesteten katalytischen CK2-Untereinheiten.

Protein	Maximalkonzentration	Minimalkonzentration
CK2 α^{1-335}	5000 nM	0,1526 nM
CK2 α^{C336S}	10000 nM	0,3052 nM
hsCK2 α_{HEK}	10000 nM	0,1526 nM
hsCK2 α^{1-335}_{HEK}	4000 nM	0,122 nM
hsCK2 α^{C336S}_{HEK}	63500 nM	1,9379 nM

Nach 5 min wurden zu jedem Reaktionsansatz mit CK2 α je 10 μ l der markierten CK2 β^{1-193} hinzupipettiert, so dass die Endkonzentration der CK2 β^{1-193} 20 nM betrug und der gesamte Reaktionsansatz 0,05 % Tween 20 enthielt. Anschließend wurde je Reaktionsansatz eine Kapillare durch Kapillarkräfte beladen und in den Probenhalter eingelegt. Anschließend konnte die Messung inklusive CapScan mit der MO.Control Software gestartet werden.

Für die weiteren Inhibitormessungen wurde auch ein K_D -Wert für CK2 α^{1-335} aus *E. coli* und der markierten CK2 β^{1-193} in Anwesenheit von 1 % DMSO bestimmt. Die Messung erfolgte genauso, wie bereits oben beschrieben.

Alle Experimente wurden mindesten dreimal als Einzelmessung wiederholt.

4.10.3 Konkurrenzexperimente

Um festzustellen, ob eine Substanz CK2 β -kompetitiv wirkt, wurden die Substanzen mittels MST getestet. Hierzu wurde zunächst ein Reaktionsansatz aus 40 nM markierter CK2 β^{1-193} und 0,1 % Tween 20 hergestellt. Dazu wurden Pc und seine Derivate mit einer Konzentration

von 40 µM hinzugefügt, andere Substanzklassen mit einer Konzentration von 200 µM. Die Endkonzentrationen waren somit 20 µM bzw. 100 µM. Danach wurde mit der Lösung, welche die markierte CK2β¹⁻¹⁹³ enthielt so verfahren, wie unter 3.9.2 beschrieben. Währenddessen wurde, ebenso wie unter 3.9.2 beschrieben, eine serielle Verdünnung der CK2α¹⁻³³⁵ aus *E. coli* hergestellt. Der Konzentrationsbereich lag hierbei zwischen 5000 und 0,1526 nM. Der weitere Verlauf der Messung wurde ebenfalls so, wie unter 4.10.2 beschrieben, durchgeführt. Die Berechnung des K_i -Wertes erfolgte mit der folgenden Formel:

$$K_i = \frac{[Inhibitor]}{\left(\left(\frac{K_D(\text{mit Inhibitor})}{K_D(\text{ohne Inhibitor})} \right) - 1 \right)} \quad \text{Gl. 33}$$

5 Ergebnisse

5.1 Transfektion, Expression und Reinigung

5.1.1 Expression und Reinigung von $hsCK2\alpha^{1-335}$ aus *E. coli*

Das Plasmid zur Expression von $hsCK2\alpha^{1-335}$ (in pT7-7) wurde bereits in Vorarbeiten kloniert. Dieses Konstrukt wurde gewählt, da die Vollängen- $hsCK2\alpha$ Stabilitätsprobleme aufweisen [174]. Die Expression im Großmaßstab sowie die Aufreinigung wurden, wie in den Kapiteln 4.5.2–4.5.7 beschrieben, durchgeführt. Das Protein konnte so in guter Reinheit und Ausbeute gewonnen werden. Eine Überprüfung des Proteins mittels SDS-Gelelektrophorese zeigte eine deutliche Bande um die 35000 Da (s. Abb. 26). Diese war bereits im Lysat nach dem Zellaufschluss deutlich zu erkennen.

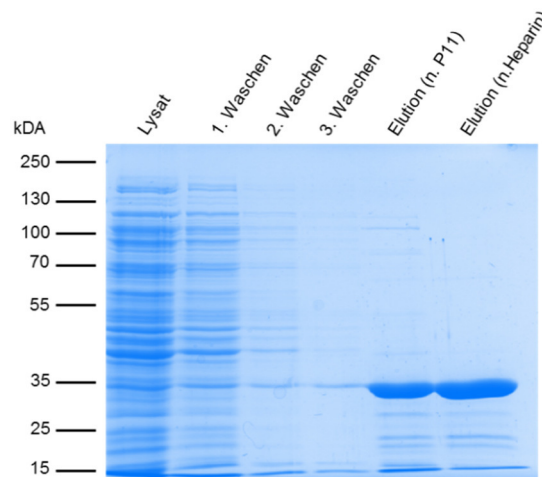


Abb. 26 SDS-PAGE einer $hsCK2\alpha^{1-335}$ -Reinigung:

Aufgetragen wurden die verschiedenen Reinigungsschritte einer $hsCK2\alpha^{1-335}$ -Reinigung. Dazu zählen das Bakterienlysat, die drei Waschschrte der P11-Reinigung, das Eluat der P11-Reinigung sowie das Eluat der Affinitätschromatographie an Heparin. Die Proteine wurden mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

5.1.2 Expression von $hsCK2\alpha^{C336S}$ in *E. coli*

Das Plasmid für die Expression von $hsCK2\alpha^{C336S}$ (in pET-Duet-1) wurde ebenfalls in Vorarbeiten gentechnisch hergestellt. In der Literatur wird beschrieben, dass dieses Konstrukt trotz der Punktmutation die gleichen Eigenschaften wie $hsCK2\alpha'$ zeigt [87]. Auch diese Expression wurde im Großmaßstab, wie unter 4.5.2 beschrieben, durchgeführt. Die Zellyse wird unter 4.5.4, die Aufreinigung mit Affinitätschromatographie mit einer Ni-NTA-Säule in Kapitel 4.5.8 beschrieben. Das Protein wurde dabei mittels eines Imidazolgradienten eluiert und konnte in großer Reinheit und Ausbeute gewonnen werden. Eine Überprüfung mittels SDS-PAGE zeigte eine deutliche Bande um die 40000 Da (Abb. 27).

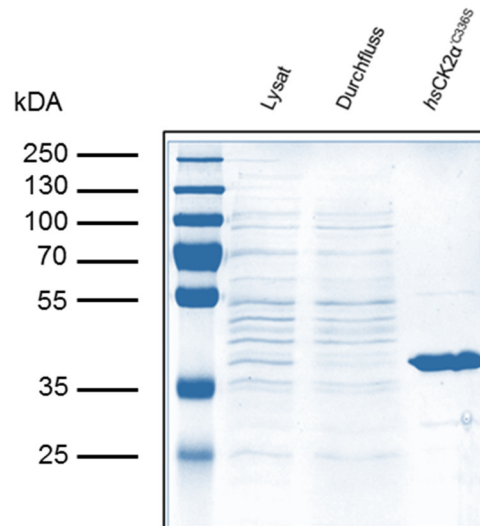


Abb. 27 SDS-PAGE einer *hsCK2α*^{C336S}-Reinigung:

Aufgetragen wurden die verschiedenen Reinigungsschritte einer *hsCK2α*^{C336S}-Reinigung. Dazu zählen das Bakterienlysat, der Durchfluss der Ni-NTA-Säule sowie das Eluat der NiNTA-Säule. Die Proteine wurden mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

5.1.3 Expression von *hsCK2β*¹⁻¹⁹³ in *E. coli*

Dieses Plasmid (in pT7-7) wurde, so wie auch die beiden anderen Konstrukte, zur Expression in *E. coli*, bereits in Vorarbeiten gentechnisch hergestellt. Es wurde die *hsCK2β*¹⁻¹⁹³-Variante verwendet, da die Wildtyp-*hsCK2β*, ähnlich wie die *hsCK2α*, keine gute Stabilität zeigt [104]. Es konnte aber bereits gezeigt werden, dass diese Variante genauso mit der *hsCK2α* wechselwirkt wie der Wildtyp [104]. Die Expression im Großmaßstab wurde so, wie für alle Expressionen in *E. coli* unter 4.5.2 beschrieben, durchgeführt. Anschließend erfolgte eine dreistufige Aufreinigung. Der erste Reinigungsschritt war die unter 4.5.3 beschriebene Affinitätschromatographie mit P11-Phosphocellulose. Darauf folgte eine Kationenaustausch-Chromatographie mit einer HiTrap-Sepharose-Q-Säule (GE Healthcare Europe) und zuletzt eine Gelpermeations-Chromatographie. Nach der Aufreinigung war nach SDS-PAGE und Anfärbung mit Coomassie eine deutliche Bande bei ca. 25000 Da im Gel zu sehen (vgl. Abb. 32).

5.1.4 Entwicklung eines eukaryotischen Überexpressionssystems für *hsCK2α*_{HEK},

***CK2α*¹⁻³³⁵_{HEK}, *CK2α*^{C336S} und *hsCK2β*¹⁻¹⁹³_{HEK}**

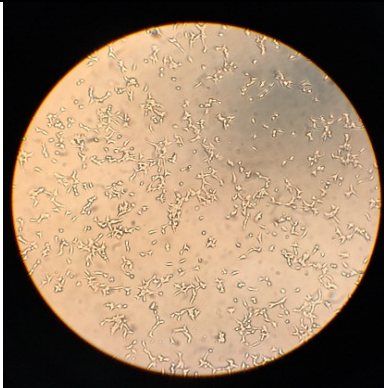
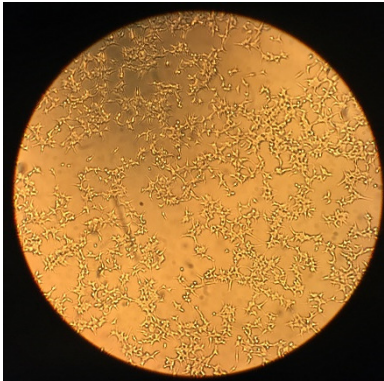
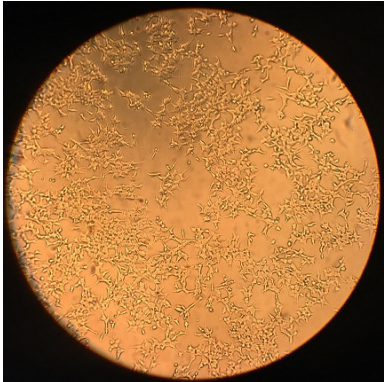
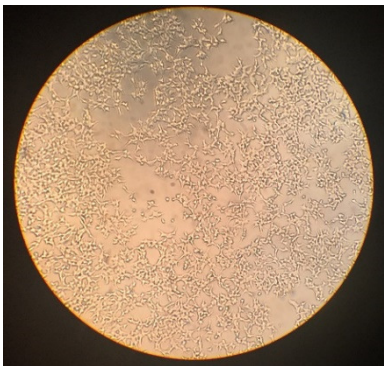
Für die rekombinante Expression von *hsCK2α*_{HEK}, *CK2α*¹⁻³³⁵_{HEK}, *CK2α*^{C336S} und *hsCK2β*¹⁻¹⁹³_{HEK} wurde ein eukaryotisches Überexpressionssystem gewählt, um mögliche posttranslationale Modifikationen (O-/N-Glykolisierung oder Phosphorylierungen) zu ermöglichen. Die drei CK2α-Konstrukte wurden erfolgreich mit Hilfe des Gibson Assembly Kit kloniert. Die *hsCK2β*¹⁻¹⁹³_{HEK} wurde auf klassischem Wege kloniert. Nach der Sequenzierung konnte die Richtigkeit aller Konstrukte bestätigt werden und mit der Expression begonnen werden. Alle Konstrukte sind

mit einem C-terminalen Doppel-Strep-Tag-II für die Aufreinigung versehen. Die Expression erfolgte semistabil in HEK293-EBNA-Zellen, welche konstitutiv das Epstein-Barr-Virus (EBV)-Kernantigen 1 (EBNA-1) exprimieren. Bei einer stabilen Transfektion wird das Plasmid dauerhaft in das Genom der Wirtszelle eingebaut. Bei einer semistabilen Transfektion, wie in dieser Arbeit durchgeführt, erfolgt der Einbau nicht in das Genom, sondern episomal. Das bedeutet, dass das Plasmid extrachromosomal mittels viraler DNA, die ebenfalls im Vektor enthalten ist, neben dem Genom im Zellkern vorliegt. In der vorliegenden Arbeit stammt die virale DNA vom EBV, genauer wurde das EBNA-1 dafür verwendet [175,176]. Für die Expression wurde der Vektor pV152 verwendet, welcher neben dem CMV-Promoter, für eine effiziente Expression, ein Signalpeptid enthält, welches für die Sekretion des exprimierten Proteins in den Zellkulturüberstand sorgt.

Die Transfektion erfolgte wie unter 4.4.13 beschrieben. Die Transfektion der beiden CK2 α -Konstrukte konnte sehr gut durchgeführt werden. Die Zellen zeigten kaum Reaktion auf die Zugabe von Selektionsmedium und ein gesteigertes Wachstum im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen. Einige der Zellen reagierten mit Apoptose auf das Selektionsmedium, waren aber vor der Zugabe konfluent gewachsen. Die Transfektion der *hsCK2 β ¹⁻¹⁹³_{HEK}* stellte sich als problematisch heraus. Bereits nach der Transfektion waren viele der Zellen abgestorben, und nach Zugabe des Selektionsmediums gab es kaum noch überlebende Zellen. In Tab. 24 sind die Wildtyp (WT)-HEK293-EBNA-Zellen zu sehen. „Vor der Transfektion“ steht dabei für die Konfluenz aller Zellen vor der Transfektion. Weiterhin wurde auch bei den Wildtyp-Zellen das Wachstum in den gleichen Zeitabständen beobachtet.

Tab. 24 Mikroskopiebilder von HEK293-EBNA-WT-Zellen (untransfiziert):

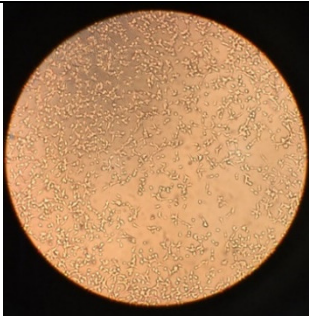
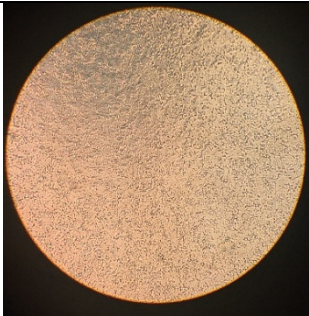
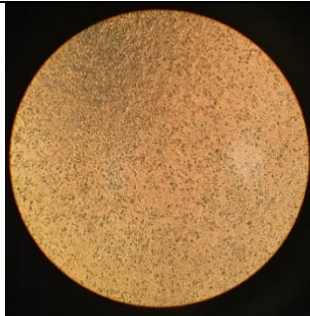
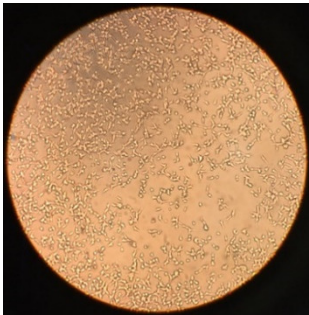
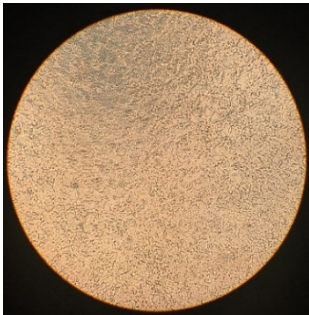
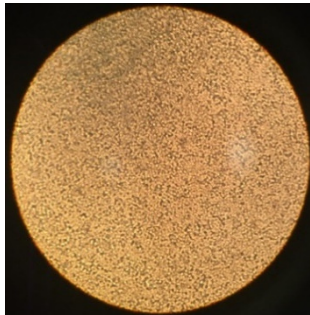
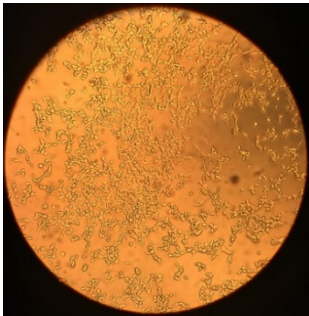
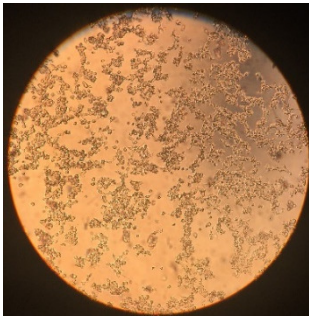
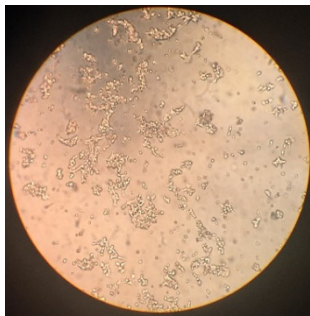
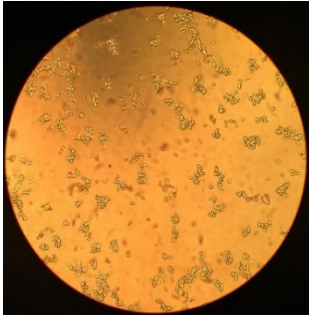
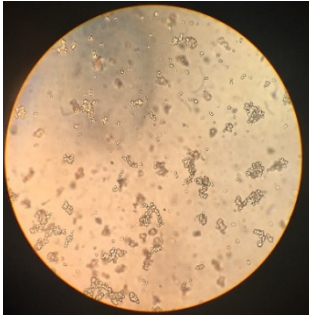
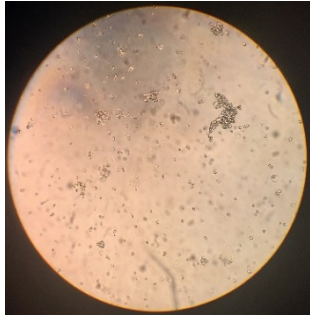
Untransfizierte und transfizierte HEK293-EBNA-WT-Zellen wurden gleich behandelt. Das Wachstum der HEK293-EBNA-Zellen wurde über einen Zeitraum von 72 h beobachtet, um einen Vergleich zwischen der Proliferation der WT-Zellen und jener der transfizierten Zellen ziehen zu können.

WT-Zellen	
Vor der Transfektion	
24 h nach der Transfektion	
48 h nach der Transfektion	
72 h nach der Transfektion	

In Tab. 25 sind Mikroskopierbilder für alle vier in HEK-293-EBNA-Zellen exprimierten Konstrukte dargestellt. Hierzu wurden drei Zeiträume gewählt, um das unterschiedliche Wachstum der transfizierten Zellen zu zeigen: 24 h nach der Transfektion, um einen möglichen Einfluss auf die Zellen durch die Transfektion selber zu beurteilen, 48 und 72 h nach Transfektion.

Tab. 25 Mikroskopiebilder der transfizierten HEK293-EBNA-Zellen:

Das Wachstum der transfizierten HEK293-EBNA-Zellen wurde über einen Zeitraum von 72 h beobachtet. Dabei war der Ausgangspunkt derselbe wie der der HEK293-EBNA-WT-Zellen. Das Wachstum wurde für alle vier in HEK293-EBNA-Zellen exprimierten Proteine (*hsCK2α_{HEK}*, *CK2α¹⁻³³⁵_{HEK}*, *hsCK2α^{C336S}_{HEK}* und *hsCK2β¹⁻¹⁹³_{HEK}*) beobachtet. Dies sollte dazu dienen, Rückschlüsse auf den Einfluss der Transfektion auf die Proliferation zu ziehen.

Konstrukt	24 h nach Transfektion (ohne Selektion)	48 h nach Transfektion (24 h Selektion)	72 h nach Transfektion (48 h Selektion)
<i>hsCK2α_{HEK}</i>			
<i>hsCK2α¹⁻³³⁵_{HEK}</i>			
<i>hsCK2α^{C336S}_{HEK}</i>			
<i>hsCK2β¹⁻¹⁹³_{HEK}</i>			

Wie bereits erwähnt, ist anhand der Bilder deutlich zu erkennen, dass die Zellen, die mit den beiden CK2α-Konstrukten transfiziert wurden, eine gesteigerte Proliferation im Vergleich zu

den Wildtyp-Zellen zeigen. Nach 48-stündiger Selektion waren bei den mit $hsCK2\beta^{1-193}_{HEK}$ transfizierten Zellen beinahe nur abgestorbene Zellen bzw. welche mit einer kugeligen Zellform zu sehen.

5.1.5 Reinigung der $hsCK2\alpha_{HEK}$, $hsCK2\alpha^{1-335}_{HEK}$ mittels P11-Phosphocellulose und Heparin

Nach der Transfektion der HEK293-EBNA-Zellen und Expression des Proteins wurde das Kulturmedium alle zwei Tage gesammelt und mit Hilfe von P11-Phosphocellulose, wie unter 3.4.4 beschrieben, im Batchverfahren gereinigt. Die Konzentrationen der aufkonzentrierten Eluate wurden mit Hilfe des *NanoDrop* sowie des berechneten Molekulargewichts inklusive Doppel-Strep-Tag-II ($M(hsCK2\alpha_{HEK}) = 48,69 \text{ kDa}$; $M(hsCK2\alpha^{1-335}_{HEK}) = 43,55 \text{ kDa}$) und des von *ProtParam* berechneten Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 72770 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt. Die Ausbeuten für beide Konstrukte waren eher gering und lagen unter 1 mg/ml . In Abb. 28 und Abb. 30 ist die Proteinauftrennung beider Konstrukte mittels SDS-PAGE zu sehen. Es erfolgte zudem eine Prüfung auf Identität mittels Western Blot. Dabei wurden die Proteine sowohl mit einem anti-CK2 α -Antikörper als auch mit einem anti-Strep-Tag-Antikörper nachgewiesen. Die Ergebnisse für den Blot der $hsCK2\alpha_{HEK}$ sind in Abb. 29 zu finden.

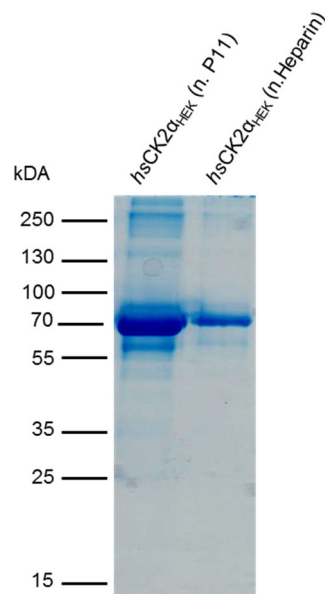


Abb. 28 SDS-PAGE der $hsCK2\alpha_{HEK}$ nach Heparin und P11-Phosphocellulose:

In der SDS-PAGE nach Heparin- und P11-Phosphocellulose-Aufreinigung ist für die $hsCK2\alpha_{HEK}$ eine klare Bande um 70 kDa zu sehen. Ebenso ist zu sehen, dass nach dem zweiten Reinigungsschritt mit Heparin zuvor vorhandene minimale Verunreinigungen entfernt werden konnten.

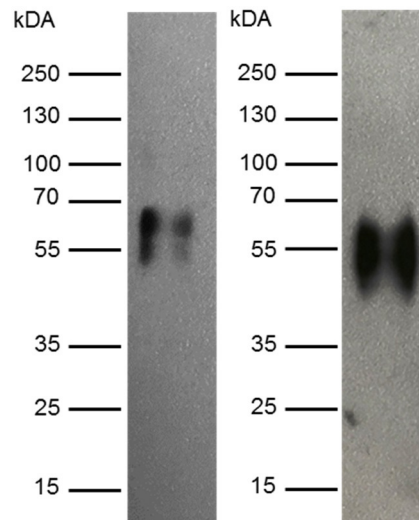


Abb. 29 Western Blot der *hsCK2α*_{HEK} nach Heparin:

Western Blots behandelt mit anti-Caseinkinase-IIα-Antikörper (links) und anti-Strep-Tag-Antikörper (rechts). Beide Blots zeigen die *hsCK2α*_{HEK} auf gleicher Höhe und mit einer Doppelbande. Eine solche war bei Expressionen in unserer Arbeitsgruppe mit HEK293-EBNA-Zellen öfter zu beobachten. Weiterhin bestätigten sie das Ergebnis der SDS-PAGE in Abb. 28.

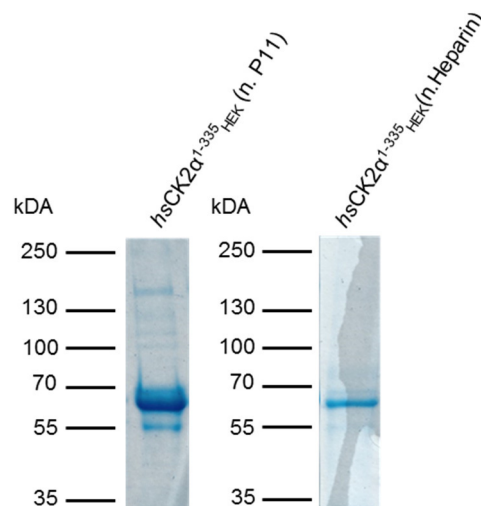


Abb. 30 SDS-Page der *CK2α*¹⁻³³⁵_{HEK} nach P11-Phosphocellulose und Heparin:

Die SDS-PAGE nach P11-Phosphocellulose- und Heparin-Aufreinigung zeigt für *hsCK2α*¹⁻³³⁵_{HEK} eine Bande bei ca. 55–60 kDa. Nach dem zweiten Aufreinigungsschritt mit Heparin wurden zuvor vorhandene minimale Verunreinigungen weiter entfernt.

5.1.6 Reinigung von *hsCK2α*_{HEK}, *hsCK2α*¹⁻³³⁵_{HEK}, *CK2α*^{C336S} und *hsCK2β*¹⁻¹⁹³_{HEK} mittels

Streptactin-Sepharose

Alle in HEK293-EBNA-Zellen exprimierten Proteine trugen einen Doppel-Strep-Tag-II. Diesen kann man sich für die Aufreinigung der Proteine zu Nutze machen. Hierzu wurden selbst befüllte 0,5-ml-Säulen mit Streptactin, einem weiterentwickelten Streptavidin-Material, verwendet. Durch die hohe Affinität ($K_D = 1 \mu\text{M}$) des Doppel-Strep-Tag-II gegenüber diesem Säulenmaterial werden die Proteine in hoher Reinheit erhalten [177]. In der vorliegenden

Arbeit konnten alle vier Konstrukte durch Reinigung der Zellkulturüberstände gewonnen werden, allerdings mit dem Nachteil von sehr geringen Ausbeuten: aus 1 l Kulturmedium wurde weniger als 1 mg Protein erhalten. Als besonders problematisch stellte sich dabei immer wieder ausfallendes Protein heraus, welches zum Verstopfen der Pumpen und Säulen führte. Die Zugabe von PMSF, einem Serinprotease-Inhibitor, hatte keinen Einfluss auf die Ausbeuten. Nach der Reinigung wurden alle Ausbeuten mit Hilfe des *NanoDrop* und der berechneten Molekulargewichte ($M(\text{hsCK2}\alpha_{\text{HEK}}) = 48,69 \text{ kDa}$; $M(\text{hsCK2}\alpha^{1-335}_{\text{HEK}}) = 43,55 \text{ kDa}$; $M(\text{hsCK2}\alpha^{\text{C336S}}_{\text{HEK}}) = 44,715 \text{ kDa}$; $M(\text{hsCK2}\beta^{1-193}_{\text{HEK}}) = 26,39 \text{ kDa}$) und des von *ProtParam* berechneten Extinktionskoeffizienten (Für α/α' : $E = 72770 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, für β : $E = 39880 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt. Die Reinheit der Proteine wurde mit Hilfe der SDS-PAGE bestimmt, die resultierenden Gele sind in Abb. 31 und Abb. 32 dargestellt. Der Nachweis der Identität erfolgte auch in diesem Fall mit Western Blots, bei denen spezifische Antikörper sowohl gegen die Proteine als auch gegen den Doppel-Strep-Tag-II eingesetzt wurden. Das Ergebnis der Blots wird in Abb. 33 und 34 gezeigt. Die Reinheit und Identität der einzelnen in HEK293-EBNA-Zellen exprimierten Proteine konnte somit verifiziert werden. Die in Abb. 35 und 36 gezeigten ELISA-Experimente, die zur Absicherung der Western-Blot-Experimente durchgeführt wurden, belegen, dass die Expression der Proteine in HEK293-EBNA-Zellen funktioniert und alle Proteine den Doppel-Strep-Tag-II tragen.

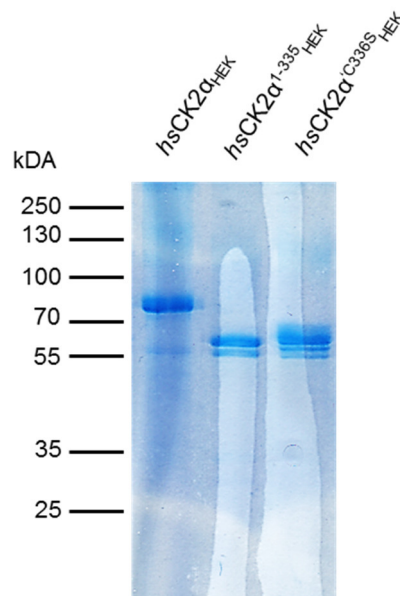


Abb. 31 SDS-Page der in HEK293-EBNA-Zellen exprimierten katalytischen CK2-Untereinheiten:

In dieser Abbildung ist die SDS-Page der in HEK293-EBNA-Zellen exprimierten katalytischen CK2-Untereinheiten $\text{hsCK2}\alpha_{\text{HEK}}$, $\text{hsCK2}\alpha^{1-335}_{\text{HEK}}$ und $\text{hsCK2}\alpha^{\text{C336S}}_{\text{HEK}}$, nach Reinigung mittels Streptactin, zu sehen. Die $\text{hsCK2}\alpha_{\text{HEK}}$ zeigt eine deutliche Bande bzw. Doppelbande bei etwa 70 kDa, die anderen beiden Proteine zeigen jeweils eine Doppelbande ($\text{CK2}\alpha^{1-335}_{\text{HEK}}$) und eine Trippelbande ($\text{hsCK2}\alpha^{\text{C336S}}_{\text{HEK}}$) bei etwa 55 kDa. Die zugehörigen Western Blots sind in Abb. 33 zu sehen.

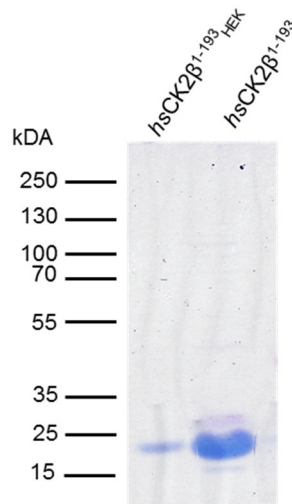


Abb. 32 SDS-Page der $hsCK2\beta^{1-193}_{HEK}$ aus HEK293-EBNA-Zellen im Vergleich zur $hsCK2\beta^{1-193}$ aus *E. coli*:

Die Abbildung zeigt die SDS-Page von in HEK293-EBNA-Zellen exprimierter $hsCK2\beta^{1-193}_{HEK}$ im Vergleich zu in *E. coli* exprimierter $hsCK2\beta^{1-193}$. Beide Proteine sind als Bande bei ca. 25 kDa sichtbar. Dies entspricht etwa der Masse des CK2 β -Monomers. Weiterhin ist zu erkennen, dass die mittels Streptactin gereinigte $hsCK2\beta^{1-193}_{HEK}$ sauber ist. Der zugehörige Western Blot für die $hsCK2\beta^{1-193}_{HEK}$ ist in Abb. 34 dargestellt.

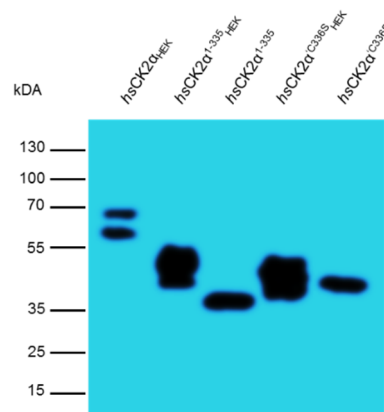


Abb. 33 Western Blot der $hsCK2\alpha_{HEK}$, $CK2\alpha^{1-335}_{HEK}$, $CK2\alpha^{C336S}$:

Diese Abbildung zeigt den spezifischen Nachweis von $hsCK2\alpha_{HEK}$, $CK2\alpha^{1-335}_{HEK}$ und $CK2\alpha^{C336S}$ im Vergleich zu den in *E. coli* exprimierten Varianten mittels anti-Caseinkinase-II α -Antikörper. Im Falle der CK2 α -Varianten lässt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den in HEK293-EBNA-Zellen und den in *E. coli* exprimierten Varianten detektieren. Die CK2 α^{C336S} -Varianten sind beide auf etwa derselben Höhe detektiert worden. Alle in HEK293-EBNA-Zellen exprimierten Varianten zeigen für die Expression Doppelbanden. Das Ergebnis des SDS-Gels konnte bestätigt werden.

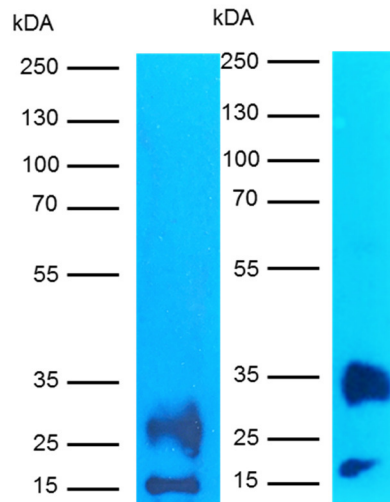


Abb. 34 Western Blot der *hsCK2β*¹⁻¹⁹³_{HEK}:

Western Blots der CK2β aus HEK293-EBNA2Zellen. Das Protein wurden mit anti-Caseinkinase-IIβ-Antikörper (links) und anti-Strep-Tag-Antikörper (rechts) identifiziert. Beide Blots zeigen Banden auf etwa der gleichen Höhe, nämlich bei ca. 25 kDa, welche denen des CK2β-Monomers entsprechen und das Ergebnis des SDS-Gels widerspiegeln.

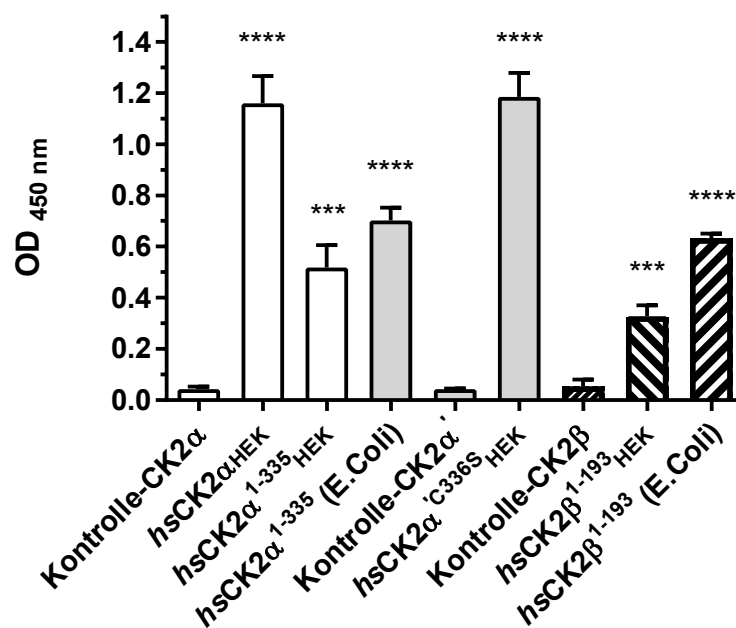


Abb. 35 ELISA zum Nachweis mit spezifischen Antikörpern gegen das jeweilige Protein:

Der ELISA dient als zusätzlicher Nachweis der in HEK-Zellen exprimierten Proteine. Alle Proteine zeigen einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle und können somit als nachgewiesen angesehen werden (**** = $p < 0,001$; *** = $p < 0,004$). Gezeigt wird das Ergebnis einer Messung im Triplikat als Mittelwert mit Standardabweichung (SD).

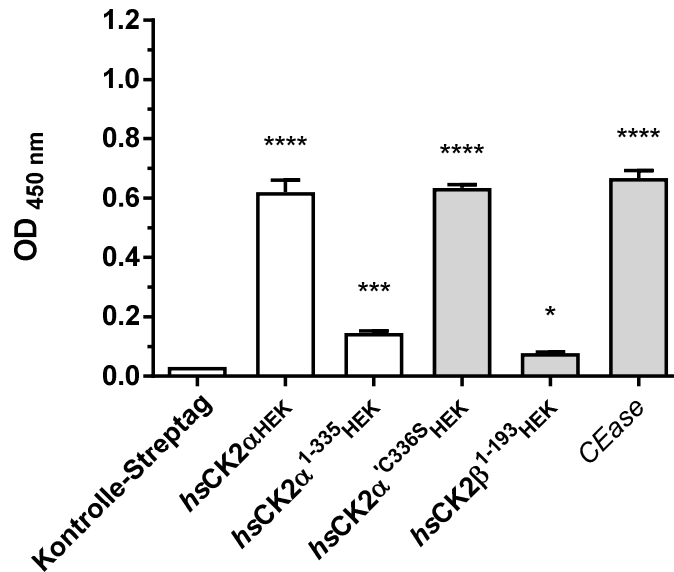


Abb. 36 ELISA zum Nachweis des Doppel-Strep-Tag-II:

Dieses ELISA-Experiment dient dazu, den C-terminal fusionierten Doppel-Strep-Tag-I nachzuweisen. Alle Proteine zeigen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (**** = $p < 0,001$; *** = $p < 0,002$; * = $p < 0,04$). Cholesterolesterase (CEase), ein ebenfalls mit Doppel-Strep-Tag-II exprimiertes Protein, dient als Positivkontrolle. Gezeigt wird das Ergebnis einer Messung im Triplikat als Mittelwert mit der Standardabweichung (SD).

5.1.7 Expression einer *hsCK2β*¹⁻¹⁹³-Variante mit C-terminalem Doppel-Streptag-II in

E. coli

Für die Expression in *E. coli* wurde mit Hilfe des Gibson Assembly Kit eine *hsCK2β*¹⁻¹⁹³-Variante mit N-terminalem Doppel-Strep-Tag-II kloniert. Dieses Protein sollte für ELISA-Experimente genutzt werden, um eine gerichtete Bindung an mit Streptactin beschichtete ELISA-Platten zu erreichen. Das Konstrukt konnte mittels Sequenzierung verifiziert werden. Die Expression und Lyse erfolgten so, wie in den Kapiteln 4.5.3 und 4.5.5 beschrieben. Gereinigt wurde das Protein mittels Affinitätschromatographie an Streptactin-Sepharose, wie unter 4.5.1 beschrieben. Durch Aufreinigung einer 2-Liter-Bakterienkultur wurde 1 ml Proteinlösung mit einer Konzentration von 9,46 mg/ml erhalten. Wie in Abb. 37 dargestellt, wurde die *hsCK2β*¹⁻¹⁹³ durch eine Bande bei knapp unter 25 kDa in der SDS-PAGE nachgewiesen. In Abb. 38 ist die Identitätsprüfung per Western Blot sowohl mit einem CK2β-spezifischen als auch einem für den Doppel-Strep-Tag-II spezifischen Antikörper zu sehen.

Die Banden passen zu denen, welche im SDS-Gel zu sehen sind. Die Identität des Proteins und seine Reinheit konnten somit zweifelsohne nachgewiesen werden.

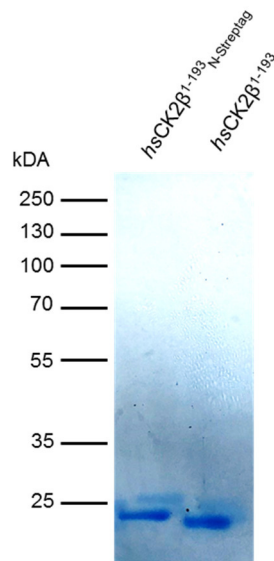


Abb. 37 SDS-Page der *hsCK2β*¹⁻¹⁹³ aus *E. coli* mit und ohne N-terminalen Doppel-Strep-Tag-II:

Die Abbildung zeigt eine SDS-Page von *hsCK2β*¹⁻¹⁹³ exprimiert in *E. coli*. Die eine Mutante trägt dabei einen N-terminal fusionierten Doppel-Strep-Tag-II (links). Dieser sollte für die gerichtete Bindung an mit Streptavidin beschichteten ELISA-Platten genutzt werden. Beide Proteine konnten mit den unter 4.5.3 beschriebenen Methoden in reiner Form gewonnen werden.

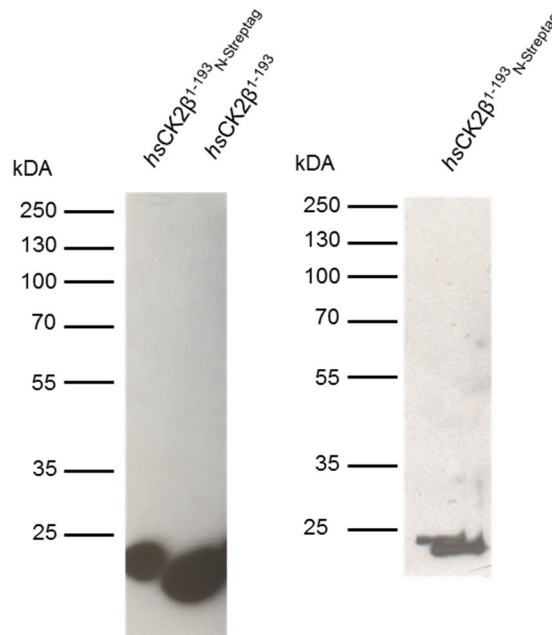


Abb. 38 Western Blot der *hsCK2β*¹⁻¹⁹³ aus *E. coli* mit und ohne N-terminalem Doppel-Strep-Tag-II:

Darstellung der zur SDS-PAGE in Abb. 37 gehörenden Western Blots. Hierbei wurde das Protein mit anti-Caseinkinase-IIβ-Antikörper (links) und anti-Strep-Tag-Antikörper (rechts)

identifiziert. Beide Blots zeigen Banden auf etwa der gleichen Höhe bei ca. 25 kDa, welche denen des CK2 β Monomers entsprechen und das Ergebnis des SDS-Gels widerspiegeln.

5.2 Peptidsynthese

5.2.1 Synthese von Pc

Die Synthese des zyklischen Peptids Pc wurde so, wie in der Diplomarbeit von *Eungyoung Yoo* beschrieben, durchgeführt und führte zu ähnlichen Ergebnissen hinsichtlich der Ausbeute [131]. Die Ausbeute in dieser Arbeit betrug 2,8 mg; *Eungyoung Yoo* erzielte 3,0 mg. Dies entspricht jeweils 63,5 % und 68 % Ausbeute in Bezug auf die theoretische Ausbeute. In Tab. 26 sind die Analyseergebnisse aufgelistet, und Abb. 39 zeigt das zugehörige RP-HPLC-Chromatogramm sowie das ESI-Massenspektrum von Pc.

Tab. 26 Charakterisierung des zyklischen Peptids PC nach der Zyklisierung:

Die Tabelle enthält das Analyseergebnis für Pc nach Zyklisierung. Der verwendete Gradient zur Bestimmung der Retentionszeit betrug 10 % auf 60 % Acetonitril in Wasser in 15 min.

Peptid	MW _{berechnet}	MW _{beobachtet} (m/z)	t _R (min)
$\text{H}_2\text{N}-\text{GCRLYGFKIHGCG}-\text{OH}$	1408,68	[M+H] ⁺ 1409,85	7,47
		[M+2H] ²⁺ 705,22	
		[M+3H] ³⁺ 470,78	

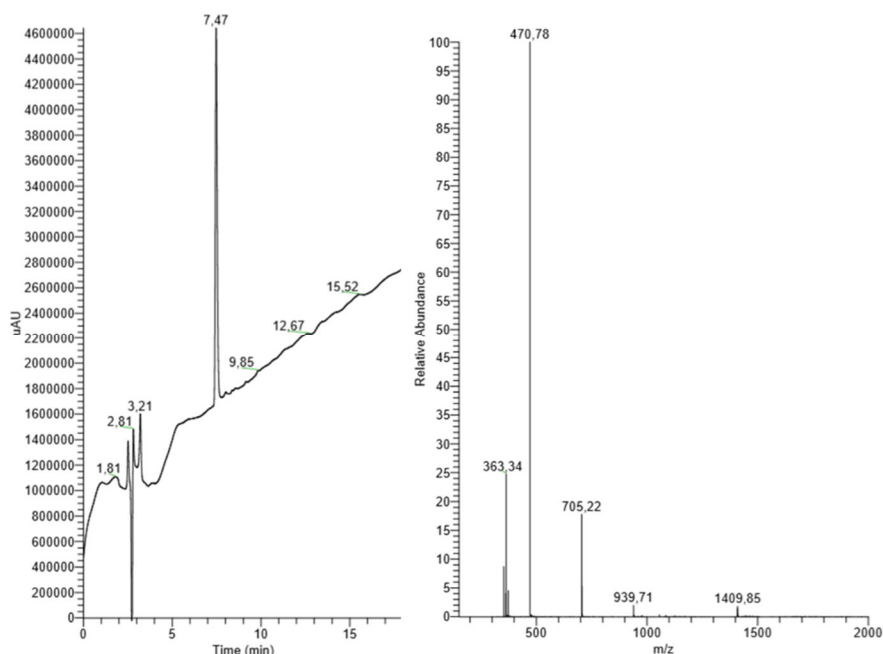


Abb. 39 RP-HPLC-Chromatogramm und ESI-Massenspektrum des zyklischen Peptids Pc:

Die Abbildung zeigt das HPLC-Chromatogramm (links) und das ESI-Massenspektrum (rechts) des zyklischen Peptids Pc. Die dazugehörigen Werte sind in Tab. 26 aufgeführt.

5.2.2 Synthese von CF-Ahx-Pc

Die Synthese des fluoreszenzmarkierten Pc wurde ebenfalls in der Diplomarbeit von *Eunyoung Yoo* durchgeführt. Auch hier wurden bei der Resynthese ähnliche Ergebnisse bezüglich der Ausbeute erzielt. In der vorliegenden Arbeit wurden 0,7 mg CF-Ahx-Pc synthetisiert; dies entspricht einer prozentualen Ausbeute von 16 %; in der Diplomarbeit von *Eunyoung Yoo* waren es 0,6 mg und 14 % Ausbeute. Bei der anschließenden Verwendung im FA-Assay wurden ähnliche Werte für CF-Ahx-Pc erhalten [7]. In Tab. 27 sind die Analyseergebnisse von CF-Ahx-Pc aufgelistet, und Abb. 40 stellt das zugehörige RP-HPLC-Chromatogramm sowie das ESI-Massenspektrum dar.

Tab. 27 Charakterisierung des zyklischen CF-Ahx-Pc

Die Tabelle enthält das Analyseergebnis für CF-Ahx-Pc nach Zyklisierung. Der verwendete Gradient zur Bestimmung der Retentionszeit betrug 10 % auf 60 % Acetonitril in Wasser in 15 min.

Peptid	MW _{berechnet}	MW _{beobachtet} (m/z)	t _R (min)
CF-Ahx-GCRLYGFKIHGCG-OH	1880,15	[M+H] ⁺ 1883,15	9,87
		[M+2H] ²⁺ 628,62	
		[M+3H] ³⁺ 471,73	

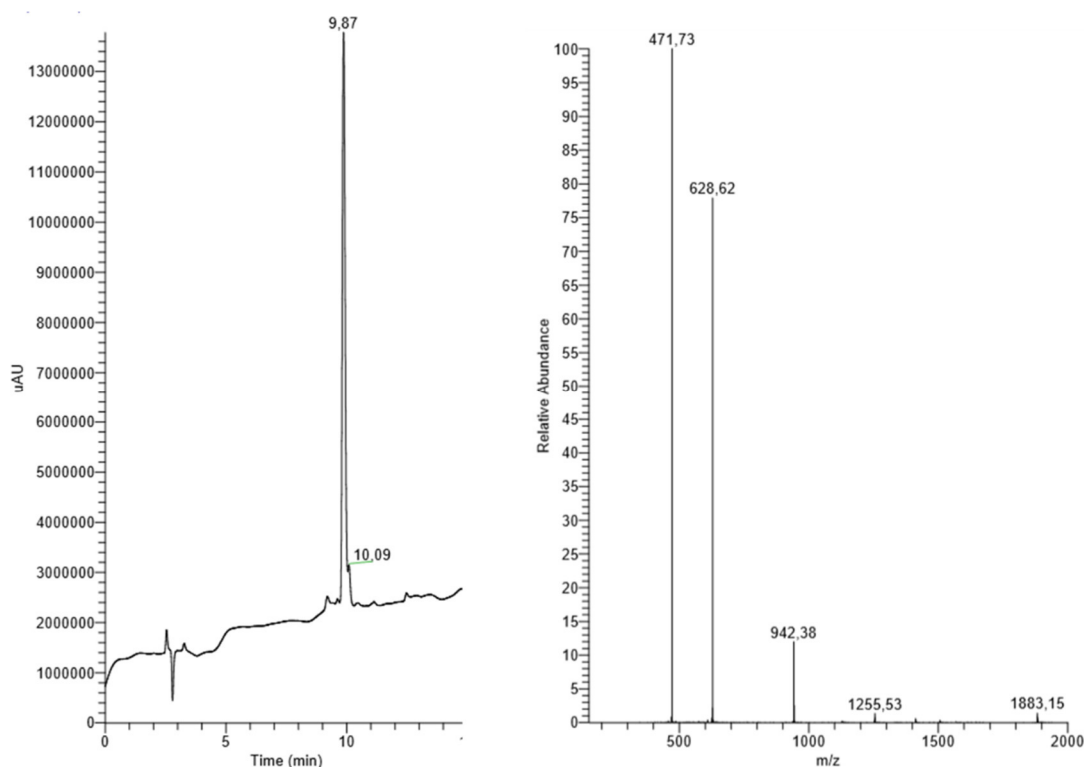


Abb. 40 RP-HPLC-Chromatogramm und ESI-Massenspektrum des zyklischen CF-Ahx-Pc:

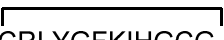
Die Abbildung zeigt das HPLC-Chromatogramm (links) und das ESI-Massenspektrum (rechts) des zyklischen CF-Ahx-Pc. Die dazugehörigen Werte sind in Tab. 27 aufgeführt.

5.2.3 Synthese eines Rhodamin-B-markierten Pc-Derivats

Bei Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen können die zu untersuchenden Inhibitoren Autofluoreszenz zeigen. Dies ist ein Problem für die Güte der FA-Messungen und kann durch die Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffs, dessen Anregungs- und Emissionswellenlängen im langwelligen Bereich des elektromagnetischen Spektrums liegen, behoben werden. Hierzu wurde versucht, ein Pc-Derivat zu synthetisieren, welches einen Rhodaminrest trägt. Besagtes Derivat konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich synthetisiert werden. Das lineare Rhodamin-B-markierte Peptid mit Sarcosin (Sar) und Aminohexansäure (Ahx) als Linker wurde synthetisiert und mittels ESI-MS eindeutig identifiziert. Die zugehörigen Werte sind in Tab. 28 aufgelistet und das Chromatogramm sowie das ESI-MS-Massenspektrum in Abb. 41 dargestellt. Das RP-HPLC-Chromatogramm zeigt jedoch deutliche Verunreinigungen. Nach der Zyklisierung dieses Peptids wurde eine Ausbeute von 102,7 mg aus zwei Synthesen erhalten, dies entspricht einer prozentualen Ausbeute von 56 %. Es konnte ebenfalls einwandfrei mittels RP-HPLC und ESI-MS identifiziert werden; die zugehörigen Werte sind in Tab. 28 aufgeführt. Da das Produkt jedoch ebenfalls verunreinigt war (Abb. 42), wurde versucht, es mittels RP-HPLC zu reinigen. Nach dieser Reinigung konnte allerdings kein Produkt mehr isoliert werden.

Tab. 28 Charakterisierung des linearen und zyklischen Rhodamin B-Sar-Ahx-Pc:

Die Tabelle enthält die Analyseergebnisse für Rhodamin B-Sar-Ahx-Pc vor und nach der Zyklisierung. Der verwendete Gradient zur Bestimmung der Retentionszeit betrug 10 % auf 60 % Acetonitril in Wasser in 15 min.

Peptid	MW _{berechnet}	MW _{beobachtet} (m/z)	t _R (min)
Rhodamin B-Sar-Ahx-GCRLYGFKIHGCG-OH	2020,55	[M+2H] ²⁺ 1010,99	10,80
		[M+3H] ³⁺ 674,61	
		[M+4H] ⁴⁺ 506,09	
Rhodamin B-Sar-Ahx-  -OH	2018,53	[M+2H] ²⁺ 1009,69	10,60
		[M+3H] ³⁺ 673,84	
		[M+4H] ⁴⁺ 505,69	

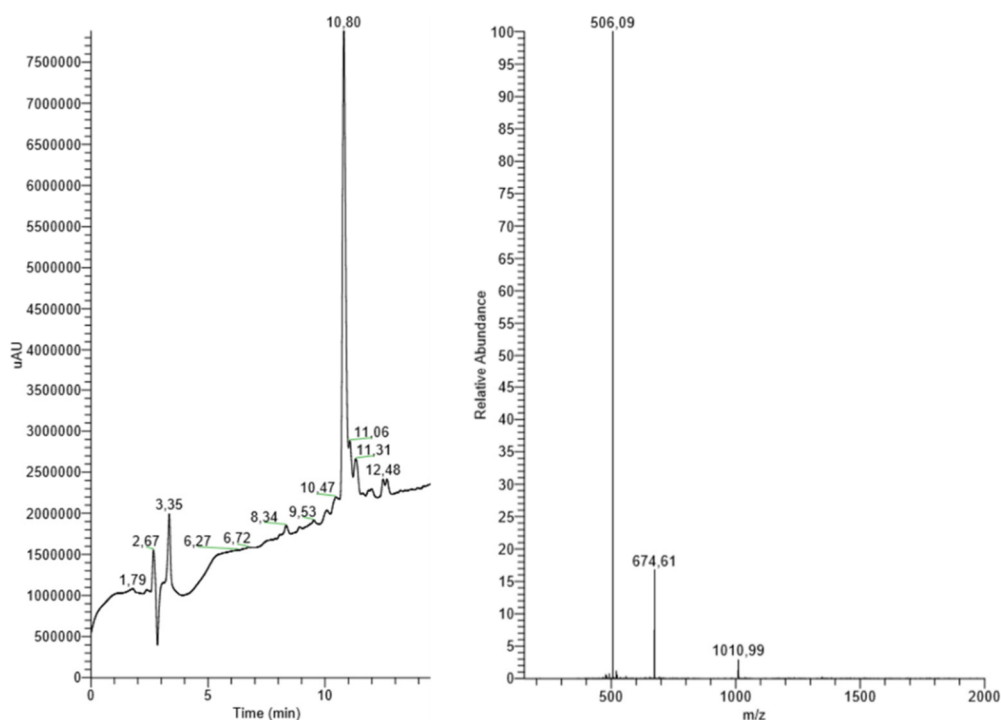


Abb. 41 RP-HPLC-Chromatogramm und ESI-Massenspektrum des linearen Peptids Rhodamin B-Sar-Ahx-Pc:

Die Abbildung zeigt das HPLC-Chromatogramm (links) und das ESI-Massenspektrum (rechts) des linearen Peptids Rhodamin B-Sar-Ahx-Pc. Die zugehörigen Werte sind in Tab. 28 aufgeführt.

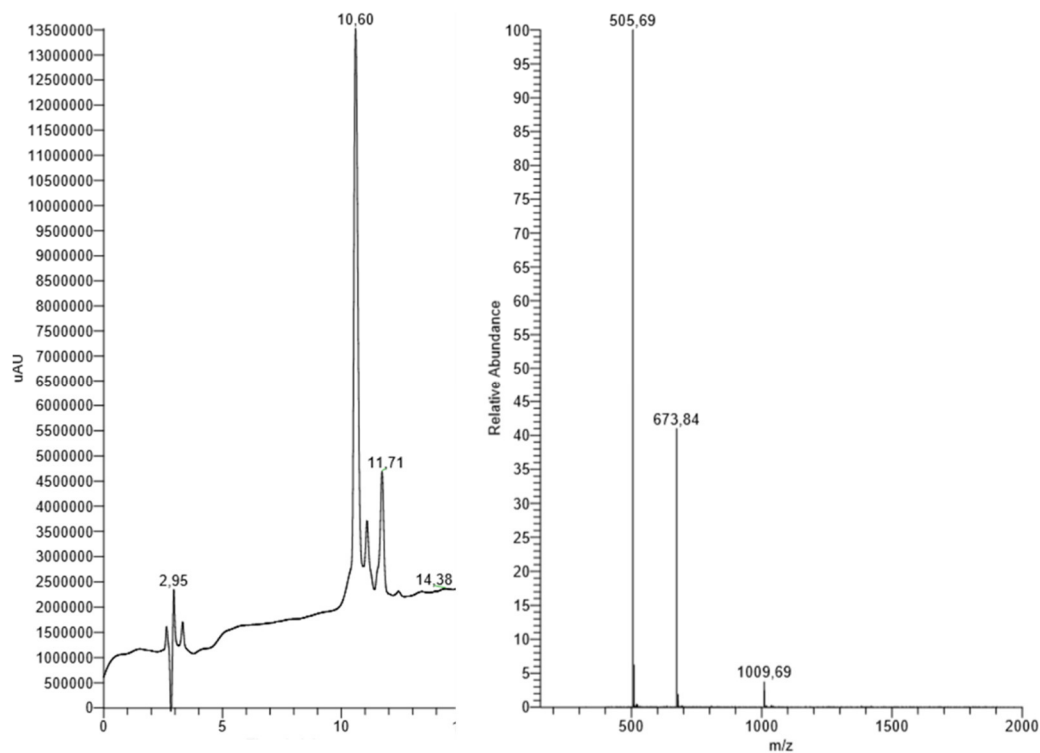


Abb. 42 RP-HPLC-Chromatogramm und ESI-Massenspektrum des zyklischen Peptids Rhodamin B-Sar-Ahx-Pc:

Die Abbildung zeigt das HPLC-Chromatogramm (links) und das ESI-Massenspektrum (rechts) des zyklischen Peptids Rhodamin B-Sar-Ahx-Pc. Die zugehörigen Werte sind in Tab. 28 aufgeführt.

5.3 Fluoreszenz-Anisotropie-Assay

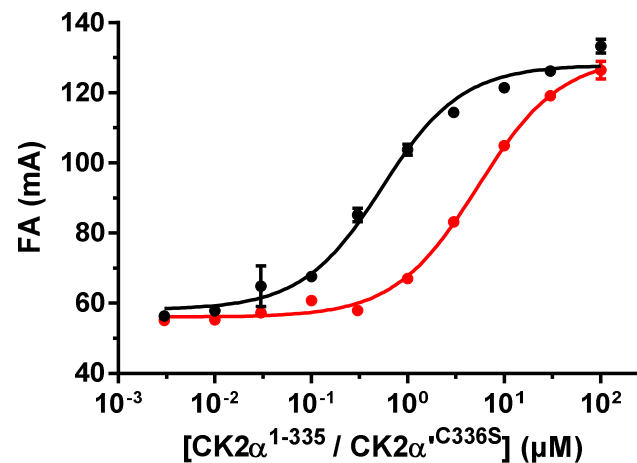
5.3.1 Bestimmung des K_D -Wertes von CF-Ahx-Pc

Für den Fluoreszenz-Anisotropie-Assay wurden bereits Vorarbeiten in der Diplomarbeit von *Eunyoung Yoo* geleistet. In der hier vorgelegten Arbeit wurden alle Messungen mit einer im Verhältnis zum K_D -Wert geringeren Konzentration (100 nM), an fluoreszenzmarkiertem Pc durchgeführt. Für die Auswahl dieser Konzentration wurde zunächst der K_D -Wert des fluoreszenzmarkierten CF-Ahx-Pc an zwei Zeitpunkten bestimmt, zum Zeitpunkt 0 min direkt nach Zugabe des CF-Ahx-Pc und mit der gleichen Probe nach 50 min Inkubationszeit. Wie später (s. Kapitel 5.3.2) gezeigt werden wird, reicht eine Messung ohne Inkubation aus, da nach 50 min. Inkubationszeit ein Verlust des FA-Signals im Vergleich zu den Werten für die FA ohne Inkubationszeit zu beobachten war [7]. Der K_D -Wert für das paraloge Protein $hsCK2\alpha^{C336S}$ wurde ebenso bestimmt, in diesem Fall aber ausschließlich ohne Inkubation. Die Werte für die Messungen mit $hsCK2\alpha^{1-335}$ und $hsCK2\alpha^{C336S}$ sind in Tab. 29 aufgelistet. Die zugehörigen Graphen ohne Inkubation sind in Abb. 43 dargestellt.

Tab. 29 K_D -Werte für die Interaktion von CF-Ahx-Pc und $CK2\alpha^{1-335}/CK2\alpha^{C336S}$:

K_D -Werte ermittelt mit 9 Konzentrationen $CK2\alpha^{1-335}$ oder $CK2\alpha^{C336S}$ (0,003-100 μ M) und CF-Ahx-Pc (100 nM) mit und ohne 50-minütiger Inkubation für $CK2\alpha^{1-335}$ und ohne Inkubation für $CK2\alpha^{C336S}$. Es sind Mittelwerte \pm SEM angegeben.

Protein	K_D , $FA_{0 \text{ min}}$ (μ M)	K_D , $FA_{50 \text{ min}}$ (μ M)	K_D , ITC (μ M)
$CK2\alpha^{1-335}$	$0,518 \pm 0,091$	$3,36 \pm 1,30$	$1,75 \pm 0,16$
$CK2\alpha^{C336S}$	$5,27 \pm 0,60$	-	

**Abb. 43 FA-Messungen zur Interaktion von CF-Ahx- Pc mit $CK2\alpha^{1-335}$ und $CK2\alpha^{C336S}$ – Bestimmung des K_D -Werts:**

Bestimmung des K_D -Werts für die Interaktion von CF-Ahx-Pc mit $CK2\alpha^{1-335}$ (schwarz) und $CK2\alpha^{C336S}$ (rot) ohne Inkubation. Die schwächere Affinität von $CK2\alpha^{C336S}$ zu CF-Ahx-Pc zeigt sich in einer Rechtsverschiebung der sigmoidalen Kurve.

Dabei zeigt sich, dass CF-Ahx-Pc eine etwa zehnfach höhere Affinität zu $hsCK2\alpha^{1-335}$ besitzt als zur paralogen $hsCK2\alpha^{C336S}$. Für $hsCK2\alpha^{1-335}$ wurde nach 50 min Inkubation ein deutlich erhöhter K_D -Wert im Vergleich zur Dissoziationskonstante ohne Inkubation gefunden. Der Grund dieser Erhöhung wurde aufgeklärt, wie im Folgenden beschrieben. Daher wurde auf die Bestimmung des entsprechenden K_D -Werts für $hsCK2\alpha^{C336S}$ verzichtet.

5.3.2 Bestimmung von IC_{50} -Werten und Berechnung der entsprechenden K_i -Werte

von Pc und seinen Derivaten an $CK2\alpha^{1-335}$

Nach der Bestimmung des K_D -Wertes von CF-Ahx-Pc wurden in Verdrängungsexperimenten die IC_{50} -Werte von Pc und zwei davon abgeleiteten Derivaten (Abb. 44) bestimmt.



Pc: X = Phe

I-Pc: X = 3-I-Phe

Cl-Pc: X = 3-Cl-Phe

Abb. 44 Strukturformeln des zyklischen Peptids Pc und seiner Derivate.

Diese Derivate, I-Pc und Cl-Pc, wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von *Dirk Lindenblatt* in der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. Ines Neundorff* (Institut für Biochemie, Department für Chemie, Universität zu Köln) synthetisiert und ihre Interaktion mit $CK2\alpha^{1-335}$ mit Hilfe der ITC (Durchführung bei 30 °C) getestet. Da alle Bestimmungen in dieser Arbeit bei 37 °C erfolgten, wurden die ITC-Messungen von *Dr. Jennifer Hochscherf* (Institut für Biochemie, Department für Chemie, Universität zu Köln) noch einmal wiederholt (Ergebnisse siehe Tab. 31 und Abb. 46). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten IC_{50} -Werte der 3 Verbindungen für die (halbmaximale) Verdrängung von CF-Ahx-Pc von $CK2\alpha^{1-335}$ sind in Tab. 30 zusammengefasst.

Tab. 30 IC_{50} -Werte des zyklischen Peptids Pc und seiner Derivate:

IC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten (h) der zyklischen Peptide PC, I-Pc und Cl-Pc für die Verdrängung von CF-Ahx-Pc (100 nM) von $CK2\alpha^{1-335}$ (3 μM). Die Messungen wurden ohne Inkubation und mit 50-minütiger Inkubation durchgeführt. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM.

Substanz	IC_{50} $FA_{0 \text{ min}}$ (μM)	h , $FA_{0 \text{ min}}$	IC_{50} , $FA_{50 \text{ min}}$ (μM)	h , $FA_{50 \text{ min}}$
Pc	$6,89 \pm 0,71$	$-2,71 \pm 0,27$	$6,30 \pm 0,86$	$-2,07 \pm 0,04$
I-Pc	$8,27 \pm 1,40$	$-2,81 \pm 0,28$	$6,70 \pm 0,75$	$-2,52 \pm 0,34$
Cl-Pc	$7,61 \pm 0,81$	$-2,21 \pm 0,07$	$6,98 \pm 0,78$	$-1,75 \pm 0,03$

Dabei ergaben sich für I-Pc IC_{50} -Werte von 8,27 μM (0 min) und 6,70 μM (50 min) und für Cl-Pc von 7,61 μM (0 min) und 6,98 μM (50 min). Die IC_{50} -Werte für beide Messzeitpunkte zeigten bei beiden Peptiden mit einem gepaarten t-test keinen signifikanten Unterschied ($P > 0,05$). Auch aus den IC_{50} -Werten der beiden Peptide wurden, wie zuvor bei Pc, die jeweiligen K_i -Werte berechnet. Diese betrugen für I-Pc 0,845 μM (0 min) und 2,50 (50 min) und für Cl-Pc 0,747 μM (0 min) und 2,65 μM (50 min). Auch diese Werte wurden auf dieselbe Weise wie zuvor die K_i -Werte von Pc statistisch miteinander verglichen und zeigten dabei für I-Pc keine signifikante Abweichung ($P > 0,05$), jedoch für Cl-Pc ($P < 0,05$) [7]. Die IC_{50} -Werte

aller drei Substanzen sind sowohl für die Messungen ohne Inkubationszeit als auch für die Messungen nach 50-minütiger Inkubation jeweils sehr ähnlich. Die zu den Messungen gehörenden Graphen sind in Abb. 45 dargestellt.

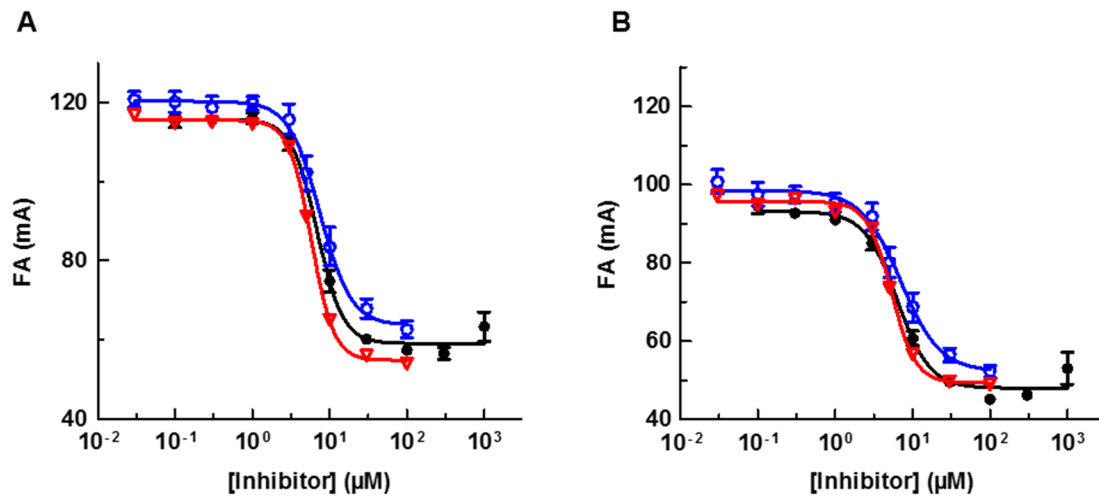


Abb. 45 Bestimmung des IC_{50} -Werts der zyklischen Peptide Pc, I-Pc und Cl-Pc:

IC_{50} -Kurven der zyklischen Peptide Pc (schwarz), I-Pc (rot) und Cl-Pc (blau) für Messungen ohne Inkubation (A) und nach 50-minütiger Inkubation (B).

Mit Gl. 31 (s. Kapitel 4.9.3) wurden, ausgehend von den bestimmten IC_{50} -Werten, die K_i -Werte der drei zyklischen Peptide Pc, I-Pc und Cl-Pc berechnet. Zudem wurde der internetbasierte K_i -Rechner auf http://sw16.im.med.umich.edu/software/calc_ki/ verwendet. Die K_i -Werte sind für beide Messzeitpunkte in Tab. 31 aufgelistet.

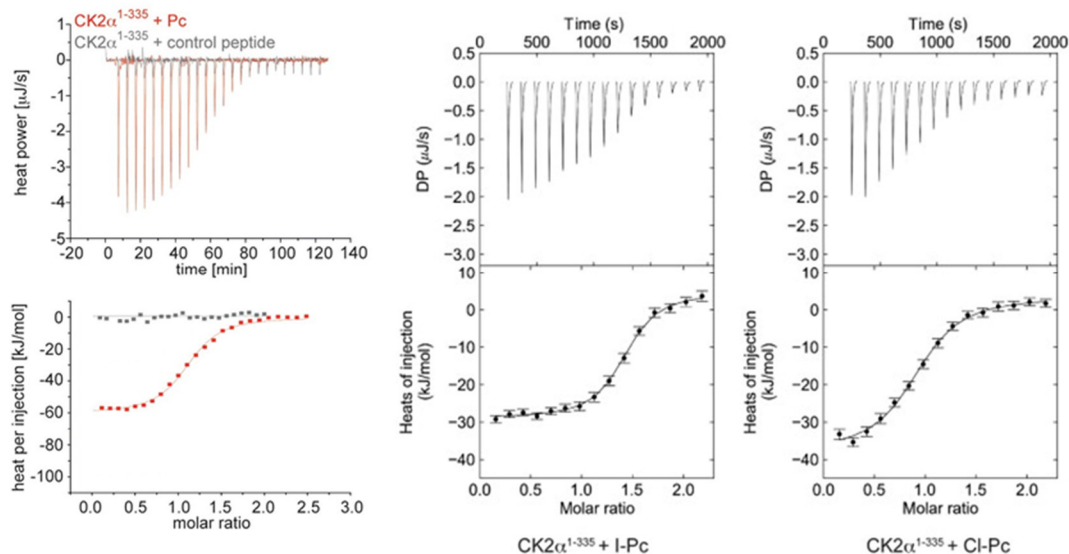


Abb. 46 ITC-Graphen und daraus ermittelte K_D -Graphen der zyklischen Peptide Pc, I-Pc und Cl-Pc:

In dieser Abbildung sind die ITC-Messkurven zur K_D -Wert Bestimmung der zyklischen Peptide mit $hsCK2\alpha^{1-335}$ zu sehen. Die Messkurven wurden bestimmt, um die Ergebnisse des FA-Assays zu validieren. Die Messungen wurden von Dr. J. Hochscherf am Institut für Biochemie der Universität zu Köln durchgeführt.

Tab. 31 Berechnete K_i -Werte der zyklischen Peptide:

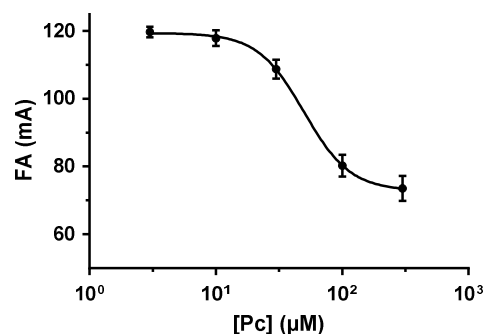
Substanz	K_i FA _{0 min} (μM)	K_i , FA _{50 min} (μM)	K_D , ITC
Pc	$0,641 \pm 0,142$	$2,29 \pm 0,62$	$0,560 \pm 0,128$
I-Pc	$0,845 \pm 0,243$	$2,50 \pm 0,61$	$0,239 \pm 0,010$
Cl-Pc	$0,747 \pm 0,164$	$2,64 \pm 0,64$	$1,06 \pm 0,07$

Die Ergebnisse zeigen, dass alle drei Inhibitoren mit einander ähnlichen K_D -Werten im hoch-nanomolaren bzw. niedrig-mikromolaren Bereich an $hsCK2\alpha^{1-335}$ binden, wobei die 50-minütige Inkubation einen etwa dreifachen Anstieg der Dissoziationskonstanten zur Folge hat. Weiterhin zeigen die Messwerte nach 50 min einen signifikanten Unterschied zu den in ITC-Experimenten bestimmten K_D -Werten ($P < 0,05$, one-way ANOVA mit Dunett's multiplem Vergleichstest).

5.3.3 Bestimmung des IC_{50} -Werts und Berechnung des K_i -Werts für Pc an

$hsCK2\alpha'^{C336S}$

Der IC_{50} -Wert in Anwesenheit von Pc für die Verdrängung von CF-Ahx-Pc wurde für $hsCK2\alpha'^{C336S}$ ebenso wie bei $hsCK2\alpha^{1-335}$ bestimmt. Da der K_D -Wert von CF-Ahx-Pc an $hsCK2\alpha'^{C336S}$ deutlich höher als der entsprechende K_D -Wert an $hsCK2\alpha^{1-335}$ ist (s. Tab. 29), wurde das Verdrängungsexperiment mit $30 \mu\text{M}$ $hsCK2\alpha'^{C336S}$ anstelle der $3 \mu\text{M}$ $hsCK2\alpha^{1-335}$ durchgeführt. Pc zeigte einen IC_{50} -Wert von $50,06 \pm 3,09 \mu\text{M}$. In Abb. 47 ist der zugehörige Graph dargestellt.

**Abb. 47 Bestimmung des IC_{50} -Werts des zyklischen Peptids Pc an $hsCK2\alpha'^{C336S}$:**

IC_{50} -Kurve für die Verdrängung von CF-Ahx-Pc (100 nM) von $hsCK2\alpha'^{C336S}$ (30 μM) durch das zyklische Peptid Pc. Abgebildet sind Mittelwerte \pm SEM aus drei Messungen.

Mit Hilfe von Gl. 31 (s. Kapitel 4.9.3) wurde der K_i -Wert für Pc an $hsCK2\alpha'^{C336S}$ berechnet. Es ergab sich ein Wert von $3,50 \pm 0,58 \mu\text{M}$, d. h. eine etwa 6-fach höhere Dissoziationskonstante als an $hsCK2\alpha^{1-335}$, die mit dem entsprechenden Wert von CF-Ahx-Pc an $hsCK2\alpha'^{C336S}$ nahezu übereinstimmt.

5.3.4 Einfluss von gegen das aktive Zentrum von $hsCK2\alpha^{1-335}$ gerichtete

Substanzen auf die Bindung von CF-Ahx-Pc

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des ATP-kompetitiven Inhibitors CX-4945 (s. Kapitel 1.5.1) und des Substratpeptids RRRDDDSDDD auf die Interaktion von CF-Ahx-Pc und $hsCK2\alpha^{1-335}$ untersucht. CX-4945 hat einen K_i -Wert von 0,38 nM und das Substratpeptid einen K_M -Wert von 240 μ M gegen humane CK2 α [178,179]. Die Abbildungen 48 und 49 zeigen die Graphen für die FA-Messungen in Anwesenheit von CX-4945 und des Substratpeptids. Bei beiden Substanzen konnte keine Veränderung der FA in Abhängigkeit von der Substanzkonzentration beobachtet werden, d. h., beide Substanzen haben keinen Einfluss auf die Interaktion von $hsCK2\alpha^{1-335}$ und CF-Ahx-Pc. Dies bedeutet zudem, dass CF-Ahx-Pc ungehindert an der CK2 β -Bindungsstelle der $hsCK2\alpha^{1-335}$ binden kann, wenn die ATP- oder die Substratbindungsstelle besetzt ist.

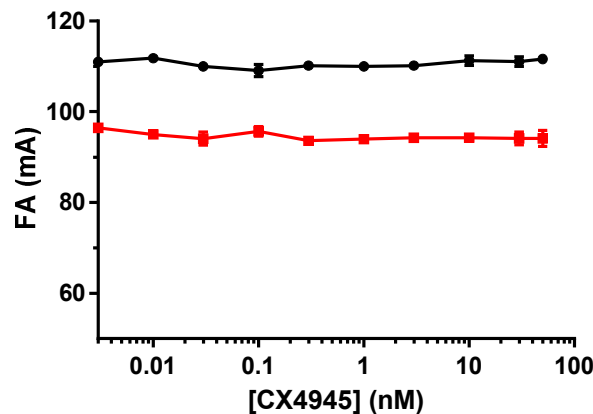


Abb. 48 FA-Messungen in Anwesenheit des ATP-kompetitiven Inhibitors CX-4945:

Graphen für FA-Messungen ohne Inkubation (schwarz) und mit 50-minütiger Inkubation (rot) in Anwesenheit von 3 μ M $hsCK2\alpha^{1-335}$, 100 nM CF-Ahx-Pc sowie des ATP-kompetitiven Inhibitors CX-4945. Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SEM von zwei Messungen im Triplikat.

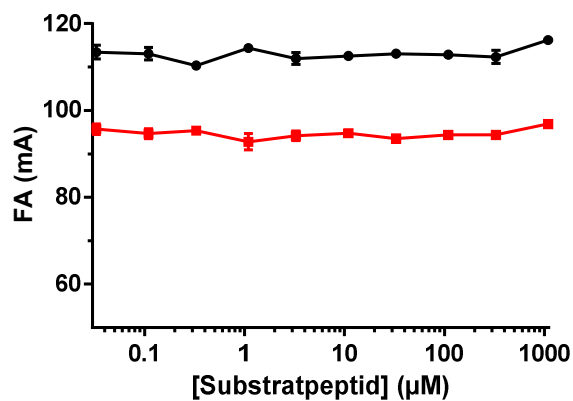


Abb. 49 FA-Messungen in Anwesenheit des Substratpeptids RRRDDDSDDD:

Graphen für FA-Messungen ohne Inkubation (schwarz) und mit 50-minütiger Inkubation (rot) in Anwesenheit von 3 μM *hsCK2α*¹⁻³³⁵, 100 nM CF-Ahx-Pc sowie des Substratpeptids. Die Graphen zeigen Mittelwerte ± SEM von zwei Messungen im Triplikat.

5.3.5 Bestimmung des Z'-Faktors

Der Z'-Faktor stellt ein Maß dar, um die Eignung eines Assays für ein Hochdurchsatzscreening zu beurteilen. Es handelt sich um einen dimensionslosen Koeffizienten dar, welcher Auskunft über das Screening-Fenster des Assays gibt. Dabei reflektiert er zum einen den Signal-Wertebereich und ob das Signal eine ausreichende Größe hat. Zum anderen kann mit ihm eine Aussage über die Varianz der Daten aus den Messungen getroffen werden, welche nicht zu groß sein sollte. Deswegen wurde der Z'-Faktor auch für den in dieser Arbeit verwendeten Assay bestimmt, um eine Aussage über die Güte treffen zu können. Um einen exzellenten Assay für Hochdurchsatzscreenings zu gewährleisten, sollte der Z'-Faktor zwischen 0,5 und 1 liegen [180]. Der Z'-Faktor ohne Inkubation betrug $0,716 \pm 0,014$; nach 50-minütiger Inkubation wurde ein Z'-Faktor von $0,694 \pm 0,008$ erhalten. In Abb. 50 sind die zugehörigen Graphen für beide Messungen dargestellt.

Auch hier zeigt sich nach 50 Minuten Inkubationszeit ein Verlust des FA-Signals im Vergleich zu den Werten für die FA ohne Inkubationszeit.

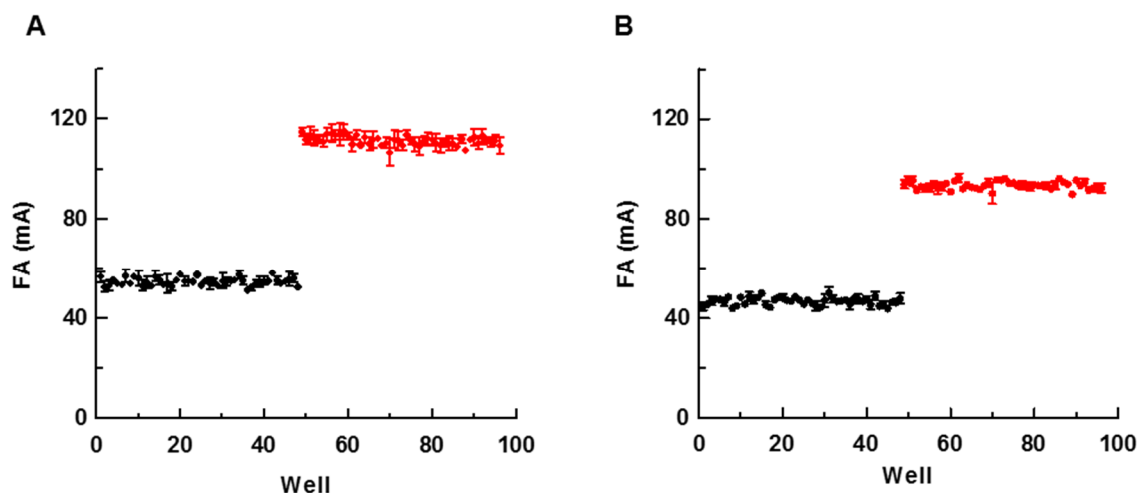


Abb. 50 Bestimmung des Z'-Faktors:

Fluoreszenz-Anisotropie von an *hsCK2α*¹⁻³³⁵ gebundenem (rot) und ungebundenem CF-Ahx-Pc (schwarz) ohne Inkubation (A) und nach 50-minütiger Inkubation (B). Die Graphen zeigen die Mittelwerte \pm SEM aus drei Messungen.

5.3.6 Screening von Podophyllotoxin-Indolo-Analoga auf ihre Fähigkeit, CF-Ahx-Pc von *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵ zu verdrängen

Wie in Kapitel 1.5.3 beschrieben, gibt es mit den Podophyllotoxin-Indolo-Analoga eine weitere Substanzklasse, welche in der Lage ist, an der CK2 α / β -Interaktionsfläche zu binden und somit zum Zerfall des CK2-Holoenzym zu führen. Das bisher wirksamste Analogon W16 (Abb. 51) wurde von *Laudet et al.* beschrieben und ausführlich als CK2-Inhibitor charakterisiert [133].

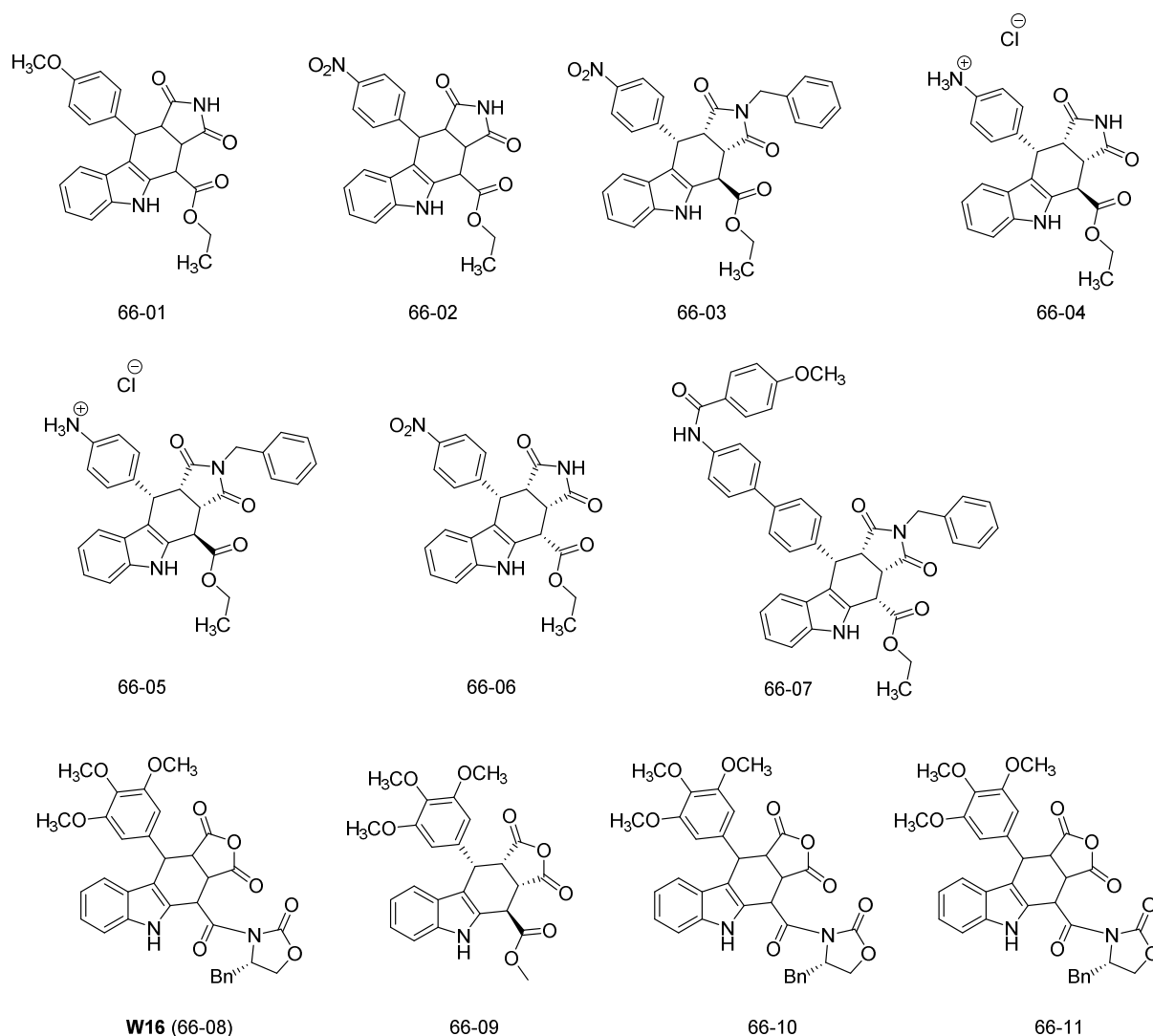


Abb. 51 Strukturformeln der Substanz W16 und ihrer Derivate.

Die Substanz W16 und neue W16-Derivate wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Bernhard Wunsch (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität Münster) synthetisiert. In Tab. 32 ist die prozentuale FA des Systems *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵/CF-Ahx-Pc in Anwesenheit drei verschiedener Konzentrationen der Verbindungen (1, 10, 100 μ M) aufgeführt.

Tab. 32 Prozentuale FA des Systems $hsCK2\alpha^{1-335}$ /CF-Ahx-Pc in Anwesenheit von W16 und seiner Derivate:

Prozentuale FA des Systems $hsCK2\alpha^{1-335}$ (3 μ M)/CF-Ahx-Pc (0,1 μ M) in Anwesenheit von W16 und seiner Derivate. Die Interaktion von $hsCK2\alpha^{1-335}$ /CF-Ahx-Pc ohne W16(-Derivat) wurde dabei zu 100 % gesetzt. Die FA wurde für jeden Inhibitor bei drei Konzentrationen bestimmt, jede davon im Duplikat. Aufgeführt sind die Mittelwerte aus zwei Messungen.

Inhibitor	1 μ M	10 μ M	100 μ M
W16 (WMS 66-08)	96,07	94,80	96,64
WMS 66-01	100,80	113,92	107,40
WMS 66-02	104,99	102,53	110,74
WMS 66-03	102,67	93,61	81,08
WMS 66-04	102,94	110,64	105,38
WMS 66-05	102,94	110,64	105,38
WMS 66-06	123,61	98,54	85,11
WMS 66-07	88,80	92,92	108,88
WMS 66-09	105,00	89,45	93,72
WMS 66-10	105,00	89,45	93,72
WMS 66-11	116,81	104,99	119,41

Keine der getesteten Substanzen war in der Lage, CF-Ahx-Pc von $hsCK2\alpha^{1-335}$ zu verdrängen. Das bedeutet aber nicht, dass die Verbindungen nicht in der Lage wären, die Bindung von CK2 α und CK2 β zu beeinflussen. Daher wurden sie weiteren Untersuchungen unterzogen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind unter 5.4.4 zu finden.

5.3.7 Screening von Indeno[1,2-*b*]indol-Derivaten auf ihre Fähigkeit, CF-Ahx-Pc von $hsCK2\alpha^{1-335}$ zu verdrängen

Durch den Arbeitskreis von *Prof. Dr. Joachim Jose* (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität Münster) wurden ebenfalls Substanzen für ein Screening zur Verfügung gestellt (Abb. 52). Die Ergebnisse der prozentualen FA des Systems $hsCK2\alpha^{1-335}$ /CF-Ahx-Pc in Anwesenheit drei verschiedener Konzentrationen der Verbindungen (1, 10, 100 μ M) sind in Tab. 33 aufgeführt.

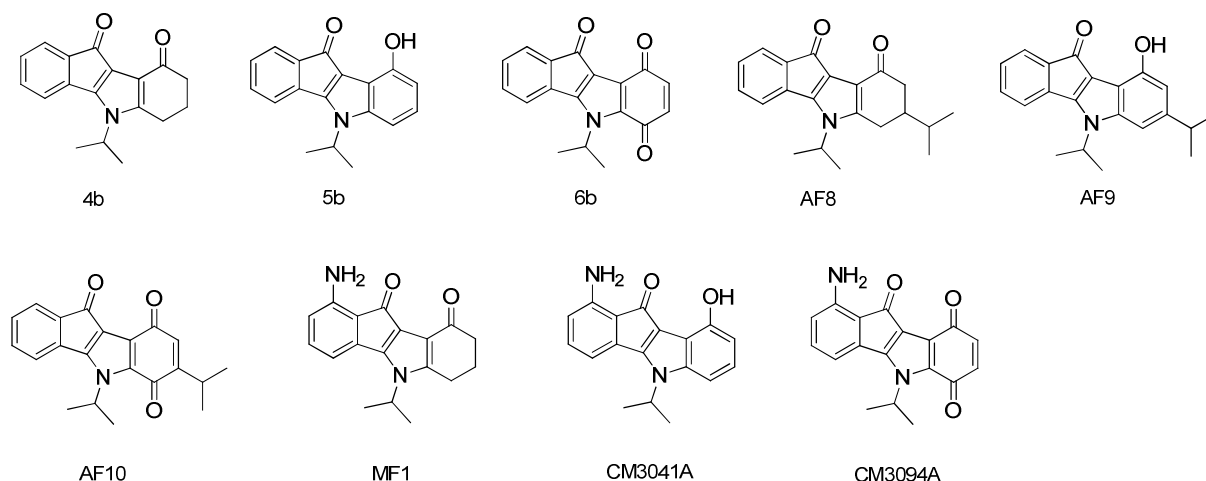


Abb. 52 Strukturformeln der Substanzen vom Indeno[1,2-*b*]indol-Typ.

Tab. 33 Prozentuale FA des Systems *hsCK2α*¹⁻³³⁵/CF-Ahx-Pc in Anwesenheit der Indeno[1,2-*b*]indole:

Prozentuale FA des Systems *hsCK2α*¹⁻³³⁵ (3 μM)/CF-Ahx-Pc (0,1 μM) in Anwesenheit von Substanzen vom Indeno[1,2-*b*]indol-Typ. Die Interaktion von *hsCK2α*¹⁻³³⁵/CF-Ahx-Pc in Abwesenheit der Indeno[1,2-*b*]indole wurde zu 100 % gesetzt. Die FA wurde für jeden Inhibitor bei drei Konzentrationen bestimmt. Aufgeführt sind die Mittelwerte aus zwei Messungen im Duplikat.

Inhibitor	1 μM	10 μM	100 μM
4b	97,17	86,14	74,03
5b	96,07	75,64	56,24
6b	105,27	86,44	75,66
AF8	97,05	78,79	64,81
AF9	104,10	98,92	90,97
AF10	100,17	103,58	97,39
MF1	91,66	77,12	73,29
CM3041A	91,40	49,56	35,81
CM3094A	93,64	60,96	44,26

Es zeigte sich, dass die Substanzen CM3041A und CM3094A die Interaktion von *CK2α*¹⁻³³⁵ und CF-Ahx-Pc inhibieren. Daher wurden für diese Substanzen IC₅₀-Werte bestimmt und daraus K_i-Werte berechnet.

5.3.8 IC₅₀-Bestimmung für CM3041A und CM3094A

Da die Substanzen CM3041A und CM3094A die Interaktion von *CK2α*¹⁻³³⁵ und CF-Ahx-Pc inhibieren, wurden sie mit Hilfe des FA-Assays weiter charakterisiert (Bestimmung des IC₅₀-Werts). Da, basierend auf dem vorausgegangenen Screening (s. Kapitel 5.3.7), ein IC₅₀-Wert im dreistellig mikromolaren Bereich erwartet wurde, erfolgte die Testung mit einer geringeren

Menge an $hsCK2\alpha^{1-335}$. Die Konzentration an $hsCK2\alpha^{1-335}$ lag bei diesen Tests bei 1 μM statt der üblichen 3 μM . In Tab. 34 sind die Ergebnisse für beide Substanzen aufgeführt.

Tab. 34 IC_{50} -Werte der Substanzen CM3041A und CM3094A:

IC_{50} -Werte der Substanzen CM3041A und CM3094A für die Hemmung der Interaktion von $hsCK2\alpha^{1-335}$ (1 μM) mit CF-Ahx-Pc (100 nM).

Substanz	IC_{50} , $FA_{0 \text{ min}}$ (μM)	h , $FA_{0 \text{ min}}$
CM3041A	233 ± 54	$-0,502 \pm 0,051$
CM3094A	330 ± 43	$-0,737 \pm 0,097$

In Abb. 53 sind die Graphen für die IC_{50} -Bestimmung der beiden Inhibitoren dargestellt. Aufgrund von Löslichkeitsproblemen konnten keine Konzentrationen von mehr als 300 μM für die Messungen verwendet werden, weshalb keine Sättigung erreicht wurde.

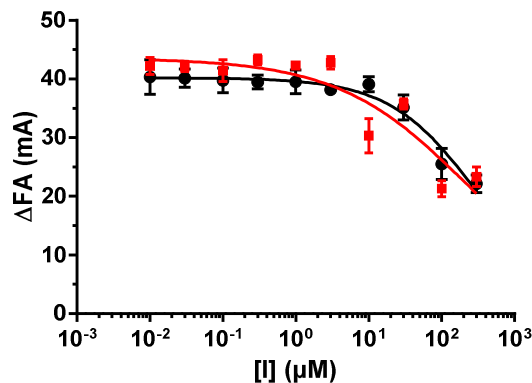


Abb. 53 IC_{50} -Bestimmung für die Substanzen CM3041A (rot) und CM3094A (schwarz):

Aufgetragen wurde hier ΔFA , bezogen auf die FA in Abwesenheit von Protein; gegen die InhibitorKonzentration.

5.4 Microscale Thermophorese

Als eine zweite Analysenmethode wurde in dieser Arbeit die Microscale-Thermophorese (MST) verwendet, für welche die $hsCK2\beta^{1-193}$ erfolgreich mittels eines roten NHS-Fluoreszenzfarbstoffes (NT-647-NHS) markiert wurde. Dieser stammte von der Firma NanoTemper Technologies GmbH und wurde speziell für die MST entwickelt.

5.4.1 Bestimmung der K_D -Werte für die Bindung von $hsCK2\beta^{1-193}$ an $hsCK2\alpha^{1-335}$ und $hsCK2\alpha^{C336S}$ aus *E. coli*

Mit Hilfe der fluoreszenzmarkierten $hsCK2\beta^{1-193}$ wurden zunächst die K_D -Werte für die Bindung der β -Untereinheit an $hsCK2\alpha^{1-335}$ und $hsCK2\alpha^{C336S}$ bestimmt, um die MST-Messungen zu validieren. Für diese beiden Proteine, exprimiert in *E. coli*, liegen ausreichend Vergleichswerte in der Literatur vor, so dass die Richtigkeit der MST-Messungen garantiert

werden kann. Der Literaturwert für die Bindung von $hsCK2\beta^{1-193}$ an $hsCK2\alpha^{1-335}$ ist 3,7 nM und der entsprechende Wert für die Bindung an $hsCK2\alpha'^{C336S}$ 45,5 nM. Beide Werte wurden per ITC ermittelt. [87] In Tab. 35 sind die in dieser Arbeit mittels MST bestimmten K_D -Werte aufgeführt und in Abb. 54 die der Ermittlung zugrunde liegenden Kurven abgebildet.

Tab. 35 K_D -Werte für die Bindung von fluoreszenzmarkierter $hsCK2\beta^{1-193}$ an $hsCK2\alpha^{1-335}$ und $hsCK2\alpha'^{C336S}$:

Die bei der MST-Messung unter Verwendung fluoreszenzmarkierter $hsCK2\beta^{1-193}$ (20 nM) und $hsCK2\alpha^{1-335}$ bzw. $hsCK2\alpha'^{C336S}$ erhaltenen K_D -Werte. Beide Werte sind in guter Übereinstimmung mit den durch ITC bestimmten K_D -Werten aus der Literatur.

Protein	K_D -Wert (nM)	K_D -Wert (nM) Literatur
$CK2\alpha^{1-335}$	$3,73 \pm 0,65$	3,7
$CK2\alpha'^{C336S}$	$42,4 \pm 20,4$	45,5

Die mit Hilfe der MST-Messungen ermittelten K_D -Werte zeigen in Übereinstimmung mit Literaturdaten eine um eine Größenordnung geringere Affinität der $hsCK2\beta^{1-193}$ zu $CK2\alpha'^{C336S}$. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen aus den FA-Messungen mit $hsCK2\beta^{1-193}$ und $hsCK2\alpha^{1-335}$ bzw. $hsCK2\alpha'^{C336S}$ (s. Tab. 29).

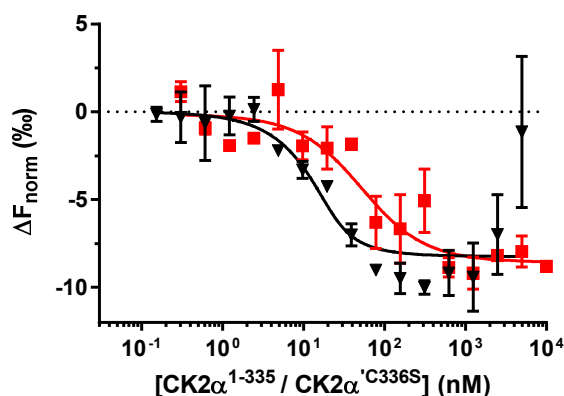


Abb. 54 K_D -Kurven der Interaktionen von $hsCK2\beta^{1-193}$ mit $hsCK2\alpha^{1-335}$ (schwarz) und $hsCK2\alpha'^{C336S}$ (rot):

Auftragung von Mittelwerten aus drei Einzelmessungen \pm SEM.

5.4.2 Bestimmung der K_D -Werte für die Bindung von $hsCK2\beta^{1-193}$ (*E. coli*) an

$hsCK2\alpha_{\text{HEK}}$, $hsCK2\alpha^{1-335}_{\text{HEK}}$ und $hsCK2\alpha'^{C336S}_{\text{HEK}}$ aus HEK293-EBNA-Zellen

Da die Ausbeuten der in HEK293-EBNA-Zellen exprimierten Proteine $hsCK2\alpha_{\text{HEK}}$, $hsCK2\alpha^{1-335}_{\text{HEK}}$ und $hsCK2\alpha'^{C336S}_{\text{HEK}}$ für Untersuchungen mit Hilfe des FA-Assays nicht ausreichten, musste hierfür eine alternative Messmethode angewendet werden. Nachdem mit Hilfe der in *E. coli* exprimierten Proteine $hsCK2\alpha^{1-335}$ und $hsCK2\alpha'^{C336S}$ die MST als Alternativmethode mit geringem Probenverbrauch validiert worden war, wurde sie für die Charakterisierung der in

HEK293-EBNA-Zellen exprimierten Proteine eingesetzt. Die ermittelten K_D -Werte für die Bindung von fluoreszenzmarkierter $hsCK2\beta^{1-193}$ an $hsCK2\alpha_{HEK}$, $hsCK2\alpha^{1-335}_{HEK}$ und $hsCK2\alpha^{C336S}_{HEK}$ sind in Tab. 36 aufgeführt.

Tab. 36 K_D -Werte für die Bindung von fluoreszenzmarkierter $hsCK2\beta^{1-193}$ an die in HEK293-EBNA-Zellen exprimierten CK2 α -Varianten.

Aufgeführt sind hier die Mittelwerte \pm SEM aus drei Messungen.

Protein	K_D -Wert (nM)
$hsCK2\alpha^{1-335}_{HEK}$	454 ± 16
$hsCK2\alpha_{HEK}$	299 ± 49
$hsCK2\alpha^{C336S}_{HEK}$	959 ± 105

Die K_D -Werte aller drei Proteine liegen deutlich höher als jene der in *E. coli* exprimierten Analoga. Das CK2 α -Volllängenprotein zeigt die höchste Affinität zu $hsCK2\beta^{1-193}$. In Abb. 55 sind die zugehörigen Graphen zu den Messungen dargestellt.

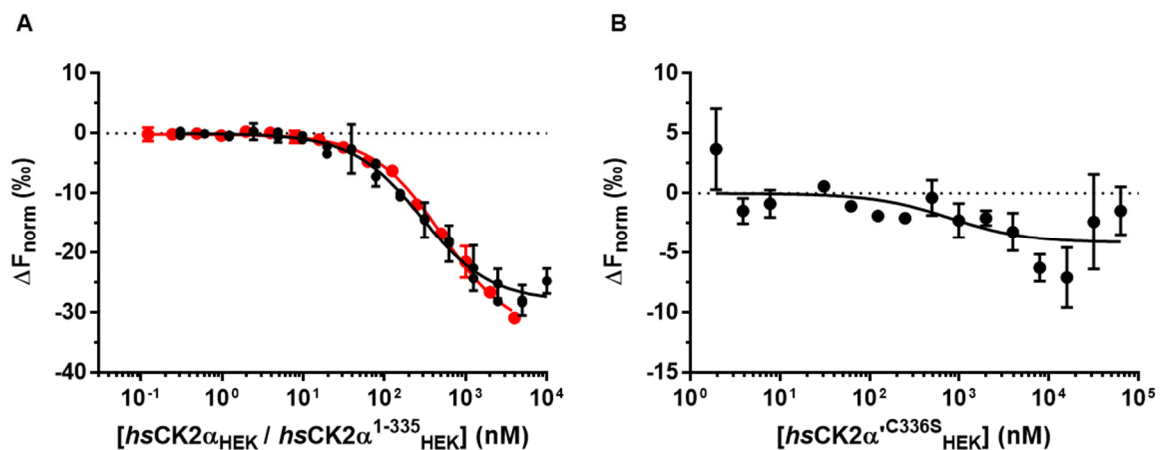


Abb. 55 K_D -Kurven der Interaktion von $hsCK2\beta^{1-193}$ (20 nM) mit $hsCK2\alpha_{HEK}$ (schwarz), $CK2\alpha^{1-335}_{HEK}$ (rot) (A) und $hsCK2\alpha^{C336S}_{HEK}$ (B):

Gezeigt werden hier die Mittelwerte \pm SEM von je drei Messungen.

5.4.3 Bestimmung der K_D -Werte für die Bindung von $hsCK2\beta^{1-193}$ an $hsCK2\alpha^{1-335}$ in Anwesenheit von Pc und seinen Derivaten

Nachdem mit Hilfe der in *E. coli* exprimierten Proteine $hsCK2\beta^{1-193}$ und $hsCK2\alpha^{1-335}$ ein valider MST-Assay etabliert worden war, wurde ein Kompetitionsassay entwickelt, der die Verdrängung der fluoreszenzmarkierten $hsCK2\beta^{1-193}$ (20 nM) von $hsCK2\alpha^{1-335}$ quantifiziert. Hierbei wurde die Dissoziationskonstante beider Proteine in Anwesenheit von 20 μM Inhibitor bestimmt. Diese Konzentration wurde in Anlehnung an die bei Raaf *et al.* beschriebenen ITC-Messungen gewählt, die ein vergleichbares Assaydesign aufwiesen [131]. Die Ergebnisse der MST-Messungen, d. h. der K_D -Wert der $hsCK2\beta^{1-193}/hsCK2\alpha^{1-335}$ -Interaktion sowie der mit Hilfe

von Gl. 33 (s. Kapitel 4.10.3) kalkulierte K_i -Wert, für das zyklische Peptid Pc und die am Phenylalaninrest substituierten Derivate I-Pc und Br-Pc sind in Tab. 37 aufgeführt.

Tab. 37 K_D -Werte der $hsCK2\beta^{1-193}/hsCK2\alpha^{1-335}$ -Interaktion in Anwesenheit der zyklischen Peptide und daraus berechneten K_i -Werte.

Aufgeführt sind hier die Mittelwerte \pm SEM aus drei Messungen.

Substanz	K_D -Wert (nM)	K_i -Wert (μ M)
Pc	79,5 \pm 26,2	0,985
I-Pc	85,0 \pm 83,7	0,878
Br-Pc	48,7 \pm 57,7	1,66

Die drei Substanzen zeigen bei den MST-Messungen ähnliche K_i -Werte im Bereich zwischen 1 und 2 μ M; im FA-Assay wird ein vergleichbares Verhalten mit K_i -Werten im Bereich 0,6–0,8 μ M beobachtet (s. Tab. 31). Die Verbindung Br-Pc wurde in der Masterarbeit von *Dirk Lindenblatt* synthetisiert und mit Hilfe des FA-Assay charakterisiert ($IC_{50} = 5,21 \mu M \pm 0,30$; $K_i = 0,380 \mu M \pm 0,062$). In Abb. 56 sind die Graphen der MST-Messungen für die drei Substanzen dargestellt.

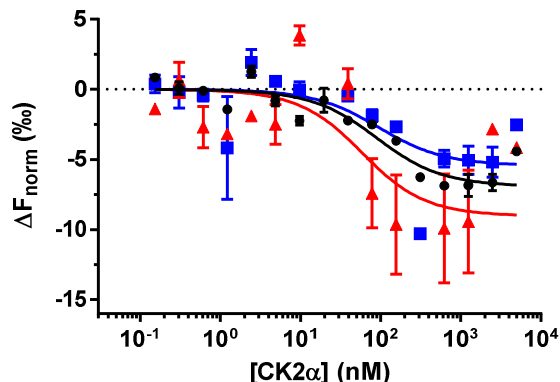


Abb. 56 K_D -Kurve der $hsCK2\alpha^{1-335}/hsCK2\beta^{1-193}$ -Interaktion in Anwesenheit der zyklischen Peptide:

Die Abbildung zeigt die Graphen für Pc (schwarz), I-Pc (blau) und Br-Pc (rot). Die Interaktionen wurden mit einer Konzentration von 20 μ M des jeweiligen Peptids gemessen. Die Graphen zeigen die Mittelwerte aus drei Einzelmessungen \pm SEM.

5.4.4 Bestimmung der K_D -Werte für die Bindung von $hsCK2\beta^{1-193}$ an $hsCK2\alpha^{1-335}$ in Anwesenheit von W16 und seiner Derivate

Für die Bestimmung der K_i -Werte der Substanzen aus dem Arbeitskreis von *Prof. Dr. Wünsch* (vgl. Kapitel 5.3.6) mit Hilfe des MST-Assays wurde zunächst der K_D -Wert der Interaktion von $hsCK2\alpha^{1-335}$ und $hsCK2\beta^{1-193}$ in Anwesenheit von 1 % DMSO bestimmt (Abb. 57). Der K_D -Wert

lag mit 12,1 nM etwas höher als ohne DMSO (3,73 nM) und wurde für die Berechnung der K_i -Werte von W16 und seiner Derivate genutzt (Tab. 38).

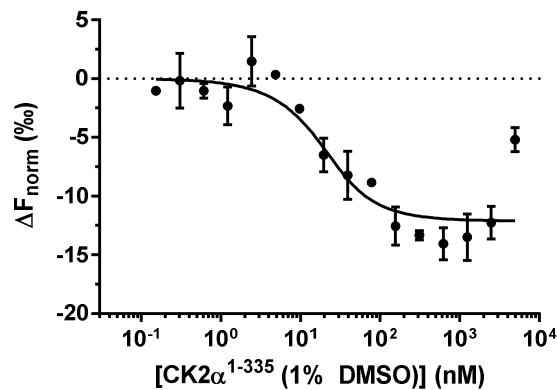


Abb. 57 Bestimmung des K_D -Werts der Interaktion von $hsCK2\alpha^{1-335}$ und $hsCK2\beta^{1-193}$ in Anwesenheit von 1 % DMSO:

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm Sem aus drei Messungen. Der hier ermittelte K_D -Wert betrug 12,1 nM.

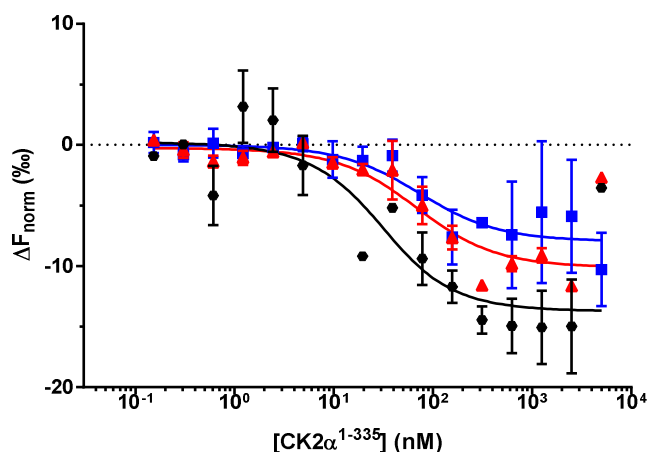
Nachdem der K_D -Wert mit 1 % DMSO bestimmt worden war, konnten die K_D -Werte in Anwesenheit der Substanzen genauso bestimmt werden wie zuvor die in Anwesenheit von Pc und seinen Derivaten. Einziger Unterschied war, dass diese Substanzen im FA-Assay keinerlei Aktivität zeigten. Weswegen mit einer finalen Inhibitorkonzentration von 100 μ M pro Messpunkt gearbeitet wurde statt mit einer von 20 μ M, wie sie bei den zyklischen Peptiden verwendet wurde. Die Ergebnisse der einzelnen Messungen sowie für die Berechnungen der jeweiligen K_i -Werte sind in Tab. 38 aufgelistet.

Tab. 38 K_D -Werte in Anwesenheit von W16 und seiner Derivate:

Die hier aufgeführten Substanzen zeigten alle eine Verschiebung des K_D -Wertes. Die Anwesenheit der Verbindungen führte zu einer geringeren Affinität von $hsCK2\alpha^{1-335}$ und $hsCK2\beta^{1-193}$. Die einzelnen K_D -Werte (Mittelwerte \pm SEM aus drei Messungen) und die daraus resultierenden K_i -Werte sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Substanz	K_D -Wert (nM)	K_i -Wert (μ M)
W16 (WMS 66-08)	$58,5 \pm 27,0$	26,1
WMS 66-02	$20,4 \pm 9,59$	146
WMS 66-04	$30,8 \pm 10,7$	64,7
WMS 66-05	$25,2 \pm 15,1$	92,4
WMS 66-06	$20,7 \pm 19,4$	141
WMS 66-07	$24,3 \pm 9,38$	92,4
WMS 66-11	$63,1 \pm 47,6$	23,7

Einige der Substanzen, welche im FA-Assay getestet wurden, lieferten bei den MST-Messungen keine auswertbaren Ergebnisse, da die Inhibitoren aggregierten und daher zu wenige Messpunkte für die Bestimmung der K_D -Werte zur Verfügung standen. Der potenteste Inhibitor dieser Substanzreihe ist W16, eine Verbindung, deren Vermögen, die $CK2\alpha/CK2\beta$ -Interaktion zu stören, bereits literaturbekannt ist. Abb. 58 zeigt die Graphen für die drei potentesten Substanzen dieser Substanzbibliothek (W16 (WMS66-08), WMS 66-04 und WMS66-11).

**Abb. 58 K_D -Kurven der potentesten Inhibitoren der W16 Analoga:**

In dieser Abbildung sind die K_D -Graphen der Substanzen WMS66-04 (schwarz), W16 (rot) und WMS 66-11 (blau) aus der Reihe der W16-Analoga zu sehen. Diese drei hemmen am stärksten kompetitiv die Bindung von $hsCK2\beta^{1-193}$ an $hsCK2\alpha^{1-335}$. Zu sehen sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei Einzelmessungen.

5.4.5 Bestimmung der K_D -Werte für die Bindung von $hsCK2\beta^{1-193}$ an $hsCK2\alpha^{1-335}$ in Anwesenheit von Indeno[1,2-*b*]indol-Derivaten

Ähnlich wie für die Substanzen von Prof. Dr. Wünsch wurden auch für die von Prof. Dr. Jose zur Verfügung gestellten Substanzen (vgl. Kapitel 5.3.7) die K_D -Werte für die Bindung von $hsCK2\beta^{1-193}$ an $hsCK2\alpha^{1-335}$ in Anwesenheit von 1 % DMSO und einer Inhibitorkonzentration von 100 μ M bestimmt. Die in MST-Experimenten ermittelten K_D -Werte sowie die daraus kalkulierten K_i -Werte sind in Tab. 39 aufgeführt.

Tab. 39 K_D -Werte in Anwesenheit von Indeno[1,2-*b*]indol-Derivaten:

Die hier aufgeführten Substanzen zeigten alle eine Änderung des K_D -Wertes. Die Anwesenheit der Verbindungen führte zu einer geringeren oder aber auch zu einer gesteigerten Affinität von $hsCK2\alpha^{1-335}$ und $hsCK2\beta^{1-193}$. Die einzelnen K_D -Werte und die daraus resultierenden K_i -Werte sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Für Substanzen, die den K_D -Wert herabsenkten, wurde kein K_i -Wert berechnet.

Substanz	K_D -Wert (nM)	K_i -Wert (μ M)
4b	6,10 \pm 4,21	-
5b	7,62 \pm 3,70	-
6b	1,79 \pm 1,08	-
AF8	8,89 \pm 6,85	-
AF10	55,6 \pm 30,6	29,9
MF1	4,93 \pm 4,97	-
CM3041A	40,9 \pm 24,0	44,9
CM3094A	24,9 \pm 26,7	99,7

Auch bei dieser Substanzbibliothek zeigte eine Substanz (AF9) bei den Messungen eine starke Aggregation und lieferte daher keine Ergebnisse. Wie bereits im FA-Assay zeigten die Substanzen CM3041A und CM3094A das Vermögen, die Interaktion zwischen $hsCK2\alpha^{1-335}$ und der fluoreszenzmarkierten $hsCK2\beta^{1-193}$ zu stören. Mit K_i -Werten von 44,9 μ M bzw. 99,7 μ M (Abb. 59) sind sie in den MST-Messungen sogar wirksamer als im FA-Assay. Der potenteste Inhibitor aus dieser Substanzbibliothek war die Substanz AF10 mit einem K_i -Wert von 29,9 μ M (Abb. 59).

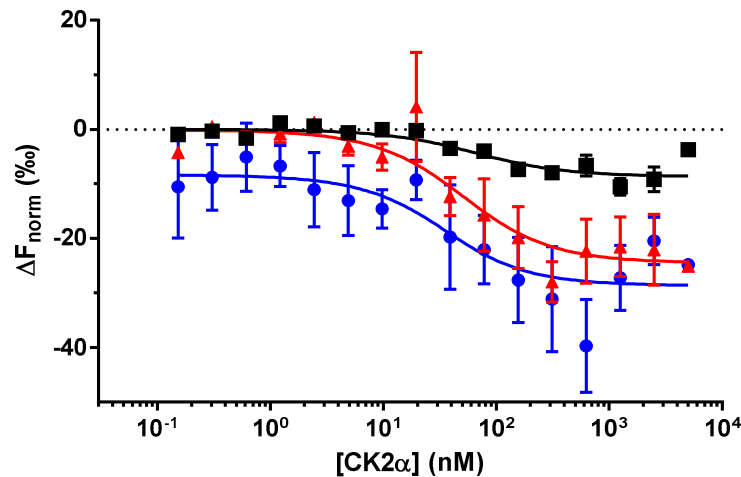


Abb. 59 K_D -Kurven der potentesten Inhibitoren vom Indeno[1,2-*b*]indol-Typ :

In dieser Abbildung sind die K_D -Kurven der drei Substanzen zu sehen, welche die Bindung von $hsCK2\alpha^{1-335}$ und $hsCK2\beta^{1-193}$ kompetitiv hemmen. Die beiden Substanzen CM3041A (rot) und CM3094A (blau) zeigten bereits im FA-Assay eine kompetitive Hemmung. AF10 (schwarz) hingegen hatte dort keine Aktivität. Zu sehen sind hier die Mittelwerte \pm SEM aus drei Einzelmessungen.

Für fünf weitere Substanzen (4b, 5b, 6b, AF8 und MF1) konnte kein K_i -Wert berechnet werden, da diese Verbindungen in der Lage waren den K_D -Wert der CK2 α /CK2 β -Interaktion zu verringern. Insbesondere hervorzuheben ist hierbei Substanz 6b, bei welcher die sigmoidale Kurve sich umkehrt. Abb. 60 zeigt die K_D -Kurve der Substanz 6b.

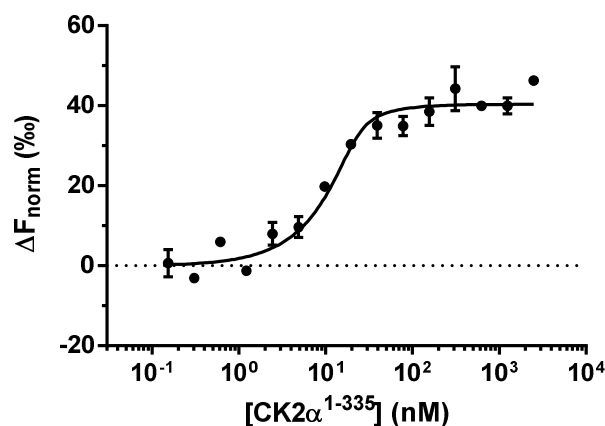


Abb. 60 K_D -Kurve der Substanz 6b:

Der K_D -Graph von Substanz 6b zeigt neben der Steigerung der Affinität von $hsCK2\beta^{1-193}$ zu $hsCK2\alpha^{1-335}$ einen veränderten Kurvenverlauf im Vergleich zu den anderen MST-Messungen.

6 Diskussion

6.1 Expression und Reinigung der verschiedenen CK2-Untereinheiten

Die Expression und Reinigung der bereits in Vorarbeiten gentechnisch hergestellten CK2-Untereinheiten wurde problemlos nach den dafür vorgesehenen Protokollen durchgeführt. Als Erstes ist hier die Expression von *hsCK2α*¹⁻³³⁵ zu nennen, welche nach dem abgewandelten Protokoll von *Ermakova et al.* [174] durchgeführt wurde. Diese CK2α-Variante wurde um 55 Aminosäuren am C-Terminus verkürzt, da die CK2α-Volllänge bei der Expression in *E. coli* Stabilitätsprobleme im Bereich des C-Terminus aufweist. Hierbei wurde eine spontane Degradation des C-Terminus beobachtet [181]. Mit der Verkürzung wurden die Stabilitätsprobleme umgangen und die *hsCK2α*¹⁻³³⁵ stabil exprimiert. *Ermakova et al.* zeigten, dass diese Mutante katalytisch genauso aktiv wie die CK2α-Volllänge ist. Im Verlauf der Proteinreinigung stellte sich heraus, dass eine Aufreinigung mit Phosphocellulose P11 im Batchverfahren genauso effektiv ist wie eine Säulenchromatographie mit P11-Material. Sie hat den Vorteil, dass für diesen Reinigungsschritt kein teures Chromatographiesystem benötigt wird. Ebenso konnte, nach der zweiten Reinigung mit Heparin, auf einen dritten Reinigungsschritt mittels Gelpermeationschromatographie verzichtet werden, da die *hsCK2α*¹⁻³³⁵ bereits eine für Experimente ausreichende Reinheit aufwies (s. Abb. 26 im Kapitel 5.1.1).

Eine weitere in Vorarbeiten hergestellte Untereinheit, welche in dieser Arbeit verwendet wurde, war die *hsCK2β*¹⁻¹⁹³. Dass sich diese verkürzte Variante der CK2β-Variante ähnlich wie die Volllängen-CK2β verhält, wurde bereits 1992 von *Boldyreff et al.* [104] gezeigt. In jener Arbeit wurde der Einfluss der Mutation auf die Wiederherstellung, die Thermostabilität, und die katalytische Aktivität des CK2-Holoenzym sowie auf sein Verhalten in Anwesenheit von Kochsalz und Heparin untersucht. Die Mutante *hsCK2β*¹⁻¹⁹³ wurde so wie *hsCK2α*¹⁻³³⁵ ausgewählt, da sie weniger Stabilitätsprobleme bei der Expression als das entsprechende Volllängenprotein aufwies. Die Aufreinigung der Mutante erfolgte mittels Affinitätschromatographie mit Phosphocellulose 11, einer Anionenaustauscher-Chromatographie mit Sepharose Q und einer anschließenden Gelpermeationschromatographie. Dabei wurde das Protein in guter Reinheit gewonnen (s. Abb. 32 Kapitel 5.1.6). Eine weitere Variante der *hsCK2β*¹⁻¹⁹³, welche N-terminal einen Doppel-Strep-Tag-II aufwies, wurde ebenfalls in hoher Reinheit isoliert (s. Abb. 37 und 38, Kapitel 5.1.7). Diese CK2β-Variante wurde für eine gerichtete Bindung des Proteins an eine mit Streptavidin beschichtete ELISA-Platte exprimiert. Die ELISA-Experimente konnten in der vorliegenden Arbeit nicht erfolgreich abgeschlossen werden.

Eine letzte Mutante, deren Plasmid bereits gentechnisch in Vorarbeiten hergestellt worden war, ist die *hsCK2α*^{C336S}. Diese, mit einem HisTag gekoppelte, Mutante wurde mittels Ni-NTA-Chromatographie gereinigt. Das Verhalten von *hsCK2α*^{C336S} wurde bereits von *Bischoff et al.*

untersucht. Die C336S-Mutation wurde eingeführt, da bei Studien mit einer Chimäre von *hsCK2α*¹⁻³²⁶ und *hsCK2α*³²⁷⁻³⁵⁰ eine Tendenz zur Dimerisierung an Cys336 über eine Disulfidbrücke festgestellt wurde. Die Bestimmung von K_m und k_{cat} für *hsCK2α*^{C336S} lieferte ähnliche Werte wie für *hsCK2α*¹⁻³³⁵. Die Mutation scheint somit keinerlei Beeinträchtigung in Bezug auf die katalytische Aktivität mit sich zu bringen [87]. Auch dieses Protein wurde in einer für die Folgeexperimente geeigneten Reinheit erhalten (s. Abb. 27 Kapitel 5.1.2). Seine Expression wird jedoch gesondert betrachtet.

Bisher wurden die drei Mutanten *hsCK2α*¹⁻³³⁵, *hsCK2α*^{C336S} und *hsCK2β*¹⁻¹⁹³ in *E. coli* exprimiert. In dieser Arbeit erfolgte die Expression jedoch überdies in HEK293-EBNA-Zellen. Zusätzlich zu den beiden C-terminalen Deletionsvarianten *hsCK2α*¹⁻³³⁵_{HEK} und *hsCK2β*¹⁻¹⁹³_{HEK} sollten weiterhin auch die beiden entsprechenden Vollängen-Konstrukte exprimiert werden. Die Expression in HEK293-EBNA-Zellen wurde gewählt, um posttranslationale Veränderungen, vor allem Phosphorylierungen und Glykolisierungen, zu ermöglichen. Die beiden paralogen Proteine CK2α und CK2α' unterscheiden sich in vier Phosphorylierungs- und einer Glykolisierungsstelle. [88,89] Weiterhin können mit Hilfe des hier verwendeten Überexpressionssystems Proteine aus Eukaryoten einfach aus dem Zellkulturüberstand gewonnen werden, da bei dieser Methode die Proteine aufgrund eines Signalpeptids in den Zellkulturüberstand abgegeben werden. Danach können sie mittels Affinitätschromatographie über den C-terminal fusionierten Doppel-Strep-Tag-II gereinigt werden. Zu diesem Zweck musste zunächst eine Klonierung der für die Transfektion benötigten Plasmide erfolgen. Die Klonierung der vier CK2α- und CK2β-Untereinheiten stellte bereits eine erste Hürde dar. Durch klassische Klonierung mittels PCR, Restriktion, Ligation und anschließender Transformation wurde lediglich *hsCKβ*¹⁻¹⁹³_{HEK} erfolgreich gentechnisch hergestellt. Bei den anderen Untereinheiten wurden auch nach mehrmaligen Versuchen nach der Transformation keine Kolonien erhalten, aus denen das gewünschte Plasmid hätte isoliert werden können. Verwendet wurden hierbei sowohl verschiedene Mengen des Transformationsansatzes beim Ausplattieren der Kulturen als auch verschiedene Plasmidkonzentrationen bei der zuvor durchgeführten Transformation. Ebenso wurden die Konzentrationen der Einsatzstoffe bei der Restriktion und Ligation verändert. Bei der Restriktion wurden die Menge an PCR-Produkt (800–100 ng) und die Konzentration der Restriktionsenzyme (10–20 U) variiert; bei der Ligation waren es die Verhältnisse von Restriktionsprodukt und Vektor (Verhältnisse zwischen 1:3 und 1:5) sowie die Menge an Ligase (5 - 10 U). Schließlich wurde das *Gibson Assembly Kit* verwendet, welches die Aktivität einer 5'-Exonuklease, einer Polymerase und einer Ligase in einer Reaktion vereinigt [169]. Mit diesem Kit wurden für *hsCK2α*_{HEK} und für *hsCK2α*¹⁻³³⁵_{HEK} Kolonien sowie Plasmide, erhalten. Durch eine anschließende Sanger-Sequenzierung wurde nachgewiesen, dass diese auch die jeweils korrekte Sequenz für das jeweilige Protein

enthielten. Die CK2 β_{HEK} wurde in einem Projektmodul von *Dirk Lindenblatt* erfolgreich rekombinant hergestellt.

Nach der erfolgreichen Herstellung der verschiedenen Plasmide wurden diese für die Transfektion von HEK293-EBNA-Zellen verwendet. Die so gewonnenen Zellen zeigten keine Reaktion auf die Selektion mittels Puromycin, was bedeutet, dass alle Zellen das transfizierte Plasmid aufgenommen hatten. Weiterhin zeigte sich, dass die mit CK2 α_{HEK} und CK2 $\alpha^{1-335}_{\text{HEK}}$ transfizierten Zellen bei der Expression ein verändertes Wachstumsverhalten aufwiesen (s. Tab. 24 und 25, Kapitel 5.1.4). Im Vergleich zu Wildtyp-HEK293-EBNA-Zellen scheint es durch die Überexpression der katalytischen CK2-Untereinheit zu einer verstärkten Proliferation der Zellen zu kommen. Dies steht im Einklang mit bereits postulierten Annahmen, welche die katalytische Untereinheit der CK2 mit verstärkter Proliferation in Verbindung bringen und ihr ein anti-apoptotisches Verhalten nachsagen.

Auch *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert endogen zwei CK2 α -Untereinheiten, CK2 α und CK2 α' [182]. *Padmanabha et al.* erzeugten ein Knockout der CK2 α' sowie einen Doppel-Knockout beider katalytischer Untereinheiten in *Saccharomyces cerevisiae* [91]. Zellen mit einem Knockout der CK2 α' waren nicht durch einen veränderten Phänotyp gekennzeichnet. Ein Knockout für beide CK2 α -Untereinheiten hatte jedoch letale Auswirkungen. Zellen, bei welchen die CK2 α -Aktivität vermindert wurde, zeigten eine veränderte Größe, ähnlich der Vergrößerung, welche dem Wachstumsstopp vorausgeht. Weiterhin bildeten sie eine Pseudomycel-Morphologie aus, und der Doppel-Knockout führte zur Flokkulation [91]. Überdies zeigten *Padmanabha et al.*, dass diese Zellen durch CK2 α aus *Drosophila* gerettet werden konnten. Das indiziert, dass CK2 α eine Rolle im Zellzyklus von *Saccharomyces cerevisiae* und dem damit verbundenen Zellwachstum spielt [183]. In Experimenten mit transgenen Mäusen, welche die CK2 α -Untereinheit in Lymphozyten überexprimierten, führte diese zu einer gesteigerten Wahrscheinlichkeit für Tumorwachstum [60]. Andere Experimente mit zwei Fibroblast-Zelllinien (NIH3T3 und CCL39) zeigten einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation, wenn diese eine inaktive CK2 α -Mutante überexprimierten [184]. Ebenso war es in weiteren humanen Tumorzelllinien der Fall, dass eine gesteigerte CK2-Aktivität essentiell für das Überleben der Zellen war und dass durch die Behandlung mit CK2-Inhibitoren Apoptose herbeigeführt werden konnte [185]. Diese Ergebnisse in ihrer Gesamtheit unterstützen die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen, dass eine Überexpression der katalytischen CK2-Untereinheit einen Einfluss auf den Zellzyklus haben kann. Ähnlich wie in den Tumorzelllinien kommt es auch hier zu einer gesteigerten Proliferation der transfizierten Zellen.

Das exprimierte Protein konnte durch die Behandlung sowohl mit Phosphocellulose P11 als auch mit Streptactin Sepharose gereinigt werden (s. Abb. 28 und Abb. 30, Kapitel 5.1.5, und

Abb. 31 Kapitel 5.1.6) Des Weiteren konnte mit einer Western-Blot-Analyse gezeigt werden, dass der C-Terminus der *hsCK2 α _{HEK}* auch nach der Reinigung noch vorhanden war und somit nicht die gleichen Stabilitätsprobleme wie bei der Expression in *E. coli* vorlagen (s. Abb. 29, Kapitel 5.1.5, und Abb. 33, Kapitel 5.1.6). Auch mit Hilfe eines ELISA-Experiments konnte der Doppel-Strep-Tag-II am C-Terminus der Proteine nachgewiesen werden (s. Abb. 35 und Abb. 36, Kapitel 5.1.6). Der C-Terminus wurde hierbei ausgewählt, da bereits in früheren Studien mit U2-OS-Zellen (Humane Osteosarkom-Zellen) gezeigt wurde, dass ein Tag am N-Terminus des Proteins zu einer geringeren CK2-Expression führt, als wenn er am C-Terminus fusioniert wird [186]. Allerdings konnte hierfür keine direkte Erklärung gefunden werden. Beide genutzten Reinigungsmethoden führten nur zu geringen Proteinausbeuten. Aus einem Liter Zellkulturmedium konnten lediglich ca. 0,3–0,5 mg reines Protein gewonnen werden. Im Vergleich zu anderen Proteinen, welche auf dieselbe Art exprimiert und gereinigt worden waren, ist dies eine sehr geringe Ausbeute. Ein Beispiel hierfür sind sowohl humane als auch murine Cholesterolesterase, welche beide ebenfalls in der Arbeitsgruppe von *Dr. Markus Pietsch* im Zentrum für Pharmakologie der Universitätsklinik Köln exprimiert wurden. Diese beiden Proteine lieferten Ausbeuten von ca. 6 mg Protein aus einem Liter Zellkulturmedium [187]. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Zellen durch die gesteigerte Proliferation nicht in der Lage sind, große Mengen CK2 α zu produzieren. Zwar sind in Zellen, die sich schneller teilen, auch mehr RNA-Polymerasen vorhanden, welche für die Transkription von Genen verantwortlich sind, doch bleibt durch die vermehrte Zellteilung nicht die Zeit, die Proteine in der Zelle bzw., wie in der vorliegenden Arbeit, im Zellkulturmedium anzureichern. Die Veröffentlichung von *Klumpp et al.*, in der gezeigt wird, dass bei Bakterien, die eine gesteigerte Wachstumsrate haben, die Proteinkonzentration abnimmt, unterstützt diese Theorie [188,189]. Eine zweite Möglichkeit könnte die geringere Thermostabilität der CK2 α sein, wenn sie nicht mit CK2 β assoziiert ist. So konnte bereits mittels Differential-Scanning-Kalorimetrie gezeigt werden, dass die katalytische CK2-Untereinheit bereits bei 37 °C zu denaturieren beginnt [52,132]. Dies entspricht genau jener Temperatur, bei der die HEK293-EBNA-Zellen inkubiert werden. Es kann also sein, dass selbst bei täglichem Wechsel des Kulturmediums ein Großteil der exprimierten CK2 α -Untereinheiten bereits denaturiert ist und es aufgrund dessen zu Problemen bei der Reinigung kommt. In unserem FA-Assay konnte schon nach 50 min eine Abnahme der CK2 α -Konzentration beobachtet werden (s. Kapitel 5.3.2 und 6.4) [7].

Weiterhin ist im SDS-Gel sowie im Western Blot zu sehen, dass die Bande für *hsCK2 α _{HEK}* bei ca. 60–70 kDa liegt, statt, wie zu erwarten, bei den durch *ProtParam* berechneten 48 kDa. Ähnlich, aber nicht so ausgeprägt, verhält es sich mit der CK2 α^{1-335} _{HEK}, deren Bande bei ca. 45–55 kDa liegt. Zu erwarten wäre nach der Berechnung des Molekulargewichtes eine Bande um 43 kDa. Vergleicht man die Banden von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵_{HEK}* und der in *E. coli* exprimierten

hsCK2 α^{1-335} , so sollten sie sich nur um die Molekularmasse des Doppel-Strep-Tag-II unterscheiden, welche ca. 3 kDa beträgt. Der Unterschied zur ausgeprägteren Bande der *hsCK2 α^{1-335} _{HEK}* ist jedoch höher. Mögliche Erklärungen für die jeweiligen Gewichtsunterschiede könnten posttranslationale Modifikationen sein, welche durch die Expression in den eukaryotischen HEK293-EBNA-Zellen zustande gekommen sind. Die katalytische Untereinheit der CK2 besitzt Phosphorylierungsstellen, die möglicherweise durch andere in der Zelle vorhandene Proteinkinasen phosphoryliert worden sein könnten. Weiterhin enthält der C-Terminus auch Glykolisierungsstellen. Glykolisierungen können nur in eukaryotischen Zellen stattfinden [88,89]. Die Glykolisierung der Proteine könnte auch eine Erklärung für die in der SDS-PAGE zu sehenden Doppelbanden sein [190].

In Tab. 25 im Kapitel 5.1.4 sind ebenfalls die Ergebnisse für Zellen, welche mit dem Plasmid für CK2 β_s transfiziert wurden, aufgeführt. Diese Zellen zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Zellen ein eingeschränktes Wachstum mit einer veränderten kugeligen Zellmorphologie. Die so transfizierten Zellen bewuchsen die Zellkulturflaschen nur sehr schwer bis zu einer Konfluenz von 100 %. Diese ist jedoch für eine optimale Proteinproduktion notwendig. Bereits vor der Selektion war ein Großteil der Zellen abgestorben oder zeigte eine abgerundete Zellform. Somit liegt es nahe, dass bereits die Transfektion mit diesem Plasmid zellulären Stress auslöst. Nach der Selektion mit Puromycin gab es kaum nicht-apoptotische Zellen, und es dauerte Wochen, bis eine ausreichende Konfluenz von 80–100 % erreicht wurde. Auch während des Projektmoduls von *Dirk Lindenblatt* wurde bei der Expression der *hsCK2 β _{HEK}* ein gehemmtes Wachstum und eine veränderte Zellmorphologie beobachtet. Daher konnte *hsCK2 β _{HEK}* mithilfe dieses Expressionssystems nicht erfolgreich isoliert werden. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits 1993 von *Roussou* und *Draetta* in der Hefe *S. Pombe* gemacht. Dort hatte die Überexpression von CK2 β eine Inhibition des Zellwachstums sowie die Cytokinese und eine kugelförmige Zellform zur Folge. *Roussou* und *Draetta* erklärten ihre Beobachtungen mit einer möglichen Konkurrenz der CK2 β und dem Holoenzym um Substratinteraktionen oder mit der möglichen Interaktion mit noch nicht identifizierten regulatorischen zellulären Komponenten. Die veränderte Zellform führten sie auf mögliche Interaktionen mit Proteinen oder deren Substraten, welche mit cytoskeletalen Strukturen assoziiert sind, oder auf die direkte Interaktion mit der Zellwand zurück [191]. Die Arbeitsgruppe um *Li et al.* konnte bei der Überexpression der CK2 β in chinesischen Hamster-Ovarienzellen (CHO-Zellen) und in 3T3-L1-Zellen (Mausfibroblasten) Ähnliches beobachten. Bei der Überexpression in CHO-Zellen zeigten die transfizierten Zellen eine verminderte Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle. Weiterhin zeigten auch diese Zellen eine veränderte morphologische Zellform. Diese gleicht der Zellform, welche Zellen annehmen, wenn sie sich im Wachstumsarrest befinden. Die Überexpression der CK2 β in 3T3 L1-Zellen hatte eine verlängerte G1-Zellzyklusphase zur Folge und eine negative Regulation der Cyclin-

D1-Expression, einem Schlüsselregulator der G1-Phase [192]. Weiterhin konnte in anderen Studien beobachtet werden, dass CK2 β bei der Schädigung von DNA beteiligt sein kann und mit Schlüsselproteinen des Zellzyklus interagiert [193,194]. Die Ergebnisse der beiden Studien stützen die hier gemachten Beobachtungen, dass die Überexpression von CK2 β einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum sowie die Form einiger Zelltypen haben kann. Die Gruppe um *Lebrin et al.* konnte diese Beobachtungen in Fibroblasten-Zellen (NIH3T3 und CCL39) nicht machen. Sie suggerierten als Erklärung, dass der Grund dafür die in diesen Studien verwendeten Zelltypen sein könnten, welche anders auf die Überexpression reagieren [184].

Die Untereinheit $hsCK2\beta^{1-193}_{HEK}$ wurde aus HEK293-EBNA-Zellen in kleinsten Mengen, weniger als 0,1 mg aus einem Liter Zellkulturmedium, gewonnen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Zellen über die lange Zeit, die sie bis zur Konfluenz benötigen, Mechanismen entwickeln, die die Expression der CK2 β inhibieren. Zellen besitzen die Möglichkeit, unbrauchbare Proteine im Proteasom mit Ubiquitin zu markieren oder zum Lysosom zu transportieren und so für den Abbau der für sie überschüssigen Proteine zu sorgen. Dieser Vorgang wird auch als Autophagie bezeichnet [195]. Eine zweite wahrscheinliche Erklärung könnte sein, dass EBNA-1 mit CK2 β interagiert, wie es von *Sivachandran et al.* [196,197] bereits gezeigt werden konnte. EBNA-1 wird in HEK293-EBNA-Zellen exprimiert, um eine episomale Replikation von oriP-Plasmiden zu ermöglichen und somit eine semistabile Transfektion zu erreichen. Es kann also sein, dass die exprimierte CK2 β durch dieses Protein sofort gebunden wird bzw. dass diese mögliche Interaktion auch einen Einfluss auf das Zellwachstum hat [196,197]. In Kapitel 5.1.6 in Abb. 32 ist ein SDS-Gel der gereinigten $hsCK2\beta^{1-193}_{HEK}$ zu sehen, welches klar zeigt, dass das Protein in hoher Reinheit gewonnen werden konnte. Ein Western Blot (s. Abb. 34, Kapitel 5.1.6) und ein ELISA-Experiment konnte die Identität des im SDS-Gel zu sehenden Proteins eindeutig nachweisen (s. Abb. 35 und 36, Kapitel 5.1.6). Das SDS-Gel zeigt auch das in *E. coli* exprimierte Protein. Beide Proteine zeigen eine Bande, die bei etwa 25 kDa liegt, welche dem CK2 β -Monomer entspricht. Im Western Blot der $hsCK2\beta^{1-193}_{HEK}$ ist eine zusätzliche Bande bei ca. 15 kDa zu sehen, welche einem möglichen Degradationsprodukt entsprechen könnte.

Die Überexpression von CK2 α'^{C336S} in HEK293-EBNA-Zellen zeigte nur einen geringen Einfluss auf das Zellwachstum im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen. Ein vermindertes Wachstum bei induzierter Expression von CK2 α' konnte von *Vilk et al.* beobachtet werden [186]. Im Gegensatz dazu wurde bei der Expression der CK2 α' in NIH 3T3- und CCL39-Fibroblasten kein Einfluss durch CK2 α' auf die Proliferation festgestellt [184]. Auch bei der Expression der CK2 α'^{C336S}_{HEK} konnten nur geringe Proteinausbeuten erzielt werden. Diese lagen im gleichen Rahmen wie bei $hsCK2\alpha_{HEK}$ und $hsCK2\alpha^{1-335}_{HEK}$. Das aufgearbeitete Protein zeigte eine hohe Reinheit (s. Abb. 31, Kapitel 5.1.6) und konnte ebenfalls mittels Western Blot

(s. Abb. 33, Kapitel 5.1.6) und ELISA (s. Abb. 35 und 36, Kapitel 5.1.6) eindeutig identifiziert werden. Die CK2 α ^{C336S}_{HEK} aus HEK293-EBNA-Zellen zeigt im Vergleich zu ihrem in *E. coli* exprimierten Pendant mehrere Banden im SDS-Gel. Das Molekulargewicht der in *E. coli* und in HEK293-EBNA-Zellen exprimierten CK2 α sollte sich theoretisch um 2 kDa unterscheiden. Die in *E. coli* exprimierte Variante trägt einen 6x HisTag, welcher das Molekulargewicht des Proteins um etwa 1 kDa erhöht, im Vergleich zu 3 kDa für den Doppel-Strep-Tag-II der CK2 α ^{C336S}_{HEK}. Allerdings zeigt die in HEK293-EBNA-Zellen exprimierte Mutante weitere Banden mit einem Molekulargewicht um die 50 kDa. Es ist fraglich, ob die Veränderung in diesem Fall durch posttranslationale Modifikationen verursacht wurde.

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass bis auf *hsCK2 β* _{HEK} und *hsCK2 β* ¹⁻¹⁹³_{HEK} eine Expression in HEK293-EBNA-Zellen grundsätzlich möglich ist. Allerdings konnten für die drei exprimierten Proteine nur geringe Ausbeuten erhalten werden; hier müsste nach weiteren möglichen Ursachen gesucht bzw. die hier exprimierten Proteine weiteren Untersuchungen unterzogen werden. Diese müssten der Aufklärung von möglichen posttranslationalen Veränderungen dienen bzw. der Frage nachgehen, ob es eventuell zu einer teilweisen Denaturierung der Proteine im Zellkulturmedium kommt. Auch das beobachtete veränderte Zellwachstum der HEK293-EBNA-Zellen nach der Transfektion sollte weiter untersucht werden.

6.2 Synthese der zyklischen Peptide

Die bereits in der Diplomarbeit von *Eunyoung Yoo* synthetisierten Peptide Pc und CF-Ahx-Pc wurden in der vorliegenden Arbeit ohne Problem nachsynthetisiert. Der Versuch, das zyklische Peptid Pc mit einer Rhodamin-B-Markierung über einen Sarcosin-Linker zu synthetisieren, konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht erfolgreich abgeschlossen werden. Zwar ließ sich eine lineare und eine zyklische Form des Rhodamin B-Sar-Ahx-Pc synthetisieren, aber das zyklische Peptid konnte – nach dem Versuch, es mittels RP-HPLC zu reinigen – nicht mehr isoliert werden (s. Abb. 41 und Abb. 42, Kapitel 5.2.3).

Die Synthese erfolgte dabei angelehnt an eine Arbeit von *Hauser et al.* [198]. Hier wurde ebenfalls Sarcosin als Linker zur Kupplung von Rhodamin B verwendet. Der Ahx-Linker wurde beibehalten, da er sich als vorteilhaft für die Interaktion zwischen CF-markiertem Peptid und CK2 α herausgestellt hatte. Zuvor hatte sich durch ITC-Studien mit CK2 α und einem direkt CF-markierten Pc-Derivat bzw. einem mit zwei Glycinresten als Linker gezeigt, dass diese Derivate nicht mit CK2 α interagieren. Dies kann durch das CF-Molekül bedingt sein, welches möglicherweise die Interaktion von CK2 α und Pc sterisch hindert, wenn es zu nah an Pc gekoppelt wird [7]. In der Arbeit von *Hauser et al.* wurde mit einem Ansatz von 1 mmol des zu markierenden Peptids gestartet und lediglich eine Ausbeute von 0,11 mmol erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 23 % [198]. In dieser Arbeit wurde lediglich mit einem Ansatz

von 66 μmol gestartet. Bei ähnlichen Ausbeuten würden ca. 7 μmol Protein resultieren. Da aber bei der Reinigung nach der Zyklisierung ein großer Verlust an Peptid zu beobachten war und auch die darauffolgende Reinigung mittels RP-HPLC Verluste mit sich brachte, konnte zum Ende der Aufarbeitung kein Protein isoliert werden. Es müsste erneut ein deutlich größerer Ansatz erfolgen, was aufgrund der automatisierten Festphasensynthese und der damit verbundenen Limitierung der Ansatzgrößen nicht möglich war, so dass eine Synthese dieses Peptids in der vorliegenden Arbeit nicht erfolgte.

6.3 Assayentwicklung

6.3.1 Fluoreszenz-Anisotropie-Assay

Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Fluoreszenz-Anisotropie (FA)-Assay sollte dazu genutzt werden CK2 β -kompetitive Substanzen zu finden, welche die Interaktion von CK2 α und CK2 β stören. Dies soll letztendlich dazu führen, dass das CK2-Holoenzym dissoziiert und die beiden CK2-Untereinheiten getrennt voneinander vorliegen. So können bestimmte Substrate, sogenannte Klasse III-Substrate, die das CK2-Holoenzym zur Phosphorylierung benötigen, nicht mehr modifiziert werden. Dieser Ansatz könnte zu selektiveren Inhibitoren, als bspw. den ATP-kompetitiven Inhibitoren führen, da die CK2 α /CK2 β - Interaktionsstelle hochspezifisch für das CK2-Holoenzym ist. Dazu muss nicht ein alleiniger CK2 β -kompetitiver Inhibitor eingesetzt werden, sondern auch die Entwicklung von Bisubstrat-Inhibitoren, welche zusätzlich die ATP- oder Substratbindungsstelle angreifen, ist vorstellbar [107]. Hierzu wurde als ein Substrat, das CK2 β nachahmende zyklische Peptid Pc genutzt und mittels eines Linkers (Ahx) mit CF gekoppelt [7].

Zum Start der Entwicklung wurde der K_D -Wert der Interaktion von CF-Ahx-Pc mit *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* über die Zeit betrachtet. Diese Vorexperimente wurden von *Dr. J. Hochscherf* durchgeführt. Es konnte ein Anstieg des K_D -Wertes über einen Zeitraum von 30 min beobachtet werden, bevor ein Plateau erreicht wurde. Aufgrund dessen wurden für die Messungen zwei Zeitpunkte, ohne Inkubation und nach 50 min Präinkubation, ausgewählt [7].

Der nächste Schritt für die Assayentwicklung war die Bestimmung des K_D -Wertes der Interaktion von CF-Ahx-Pc mit *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*. In dieser Arbeit wurde dieser Wert erneut bestimmt. Dieser war zuvor in der Diplomarbeit von *Eungyoung Yoo* bereits ermittelt worden. Allerdings wurde in der Arbeit von *Eungyoung Yoo* mit einer CF-Ahx-Pc-Konzentration von 1 μM gearbeitet; in der vorliegenden Arbeit wurden alle Messungen mit einer Konzentration von 100 nM durchgeführt. Für *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* wurde der K_D -Wert mit und ohne 50 min Inkubation bestimmt.

Die 50-minütige Inkubation wurde gewählt, um ein Gleichgewicht zwischen den einzelnen Bindungspartnern herzustellen. Bei Konkurrenzexperimenten mit CF-Ahx-Pc und Derivaten

des zyklischen Peptids PC und Pc selber (Kapitel 5.3.2) stellte sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Messzeitpunkten heraus [7]. Dieser Sachverhalt wird im Kapitel 6.4 genauer erläutert.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten K_D -Werte mit $hsCK2\alpha^{1-335}$ zeigten keine signifikanten Unterschiede zueinander (gepaarter T-test, $P > 0,05$). Zur Validierung des FA-Assays wurden durch ITC ermittelte Werte zum Vergleich eingesetzt (s. Abb. 61) [7].

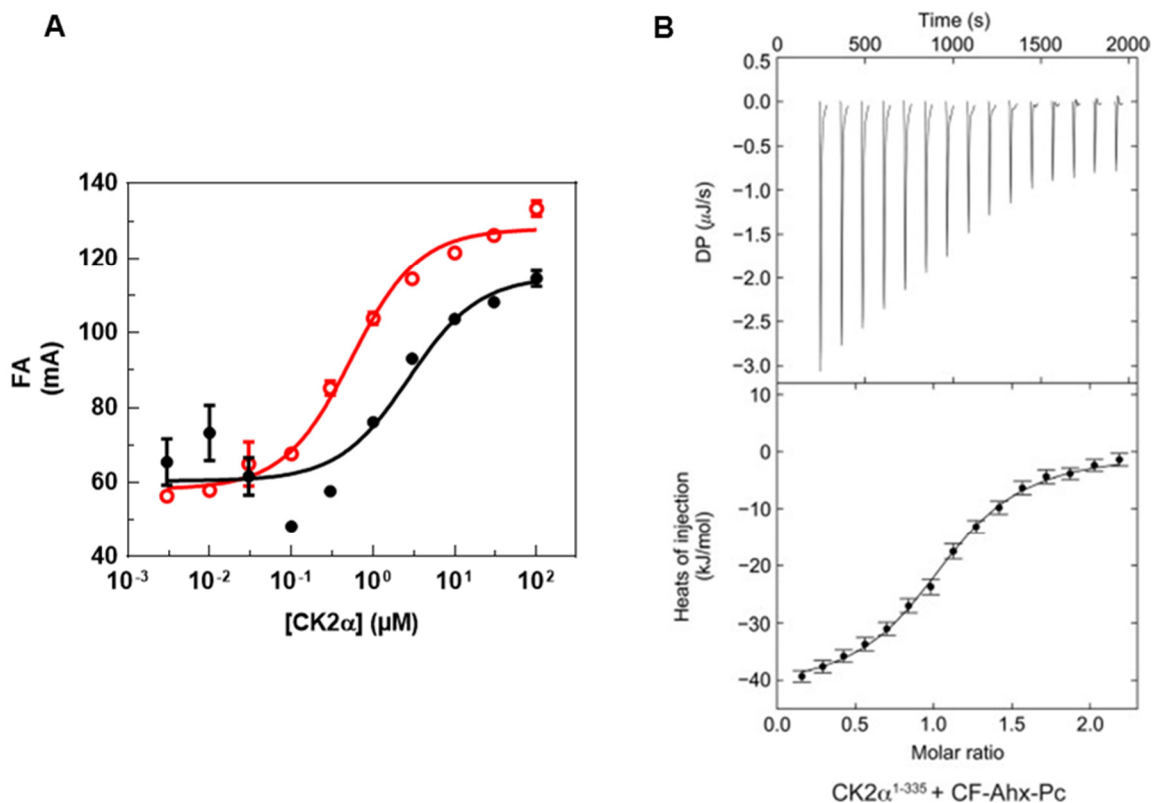


Abb. 61 K_D -Kurven der $hsCK2\alpha^{1-335}$ und CF-Ahx-Pc mit und ohne Präinkubation im FA-Assay (A) und ITC-Messung der $hsCK2\alpha^{1-335}$ und CF-Ahx-Pc (B):

A) K_D -Kurven für die Interaktion von $hsCK2\alpha^{1-335}$ und CF-Ahx-Pc im FA-Assay ohne (rot) und mit 50 min Präinkubation (schwarz). Die Kurve für die FA-Messung ohne Präinkubation wurde bereits in Abb. 43 (Kapitel 5.3.1) gezeigt. B) ITC-Messung für die Interaktion von $hsCK2\alpha^{1-335}$ mit CF-Ahx-Pc.

Mittels ITC konnte ein K_D -Wert von 1,75 μM ermittelt werden. Dieser unterscheidet sich nicht signifikant von den beiden per FA-Assay ermittelten K_D -Werten (One-way ANOVA mit Dunetts' multiplem Vergleichstest, $P > 0,05$) [7].

Unter 5.3.1 in Abb. 43 ist der Graph für $hsCK2\alpha^{C336S}$ ohne Inkubationszeit zu sehen. $hsCK2\alpha^{C336S}$ zeigt hier eine etwa 10-fach geringere Affinität zu CF-Ahx-Pc als zu $hsCK2\alpha^{1-335}$. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits in ITC-Experimenten zur Interaktion der beiden Proteine mit $hsCK2\beta^{1-193}$ gemacht. Es ergaben sich dabei K_D -Werte von 45,5 nM für $hsCK2\alpha^{C336S}$ und 3,7 nM für $hsCK2\alpha^{1-335}$ (Faktor 12). Die im FA-Assay gezeigte geringere Affinität der $hsCK2\alpha^{C336S}$ gegenüber CF-Ahx-Pc, welches die CK2β nachahmt, ist somit

vergleichbar mit dem bereits in der Literatur beschriebenen Verhalten der CK2 α -Paralogen gegenüber CK2 β [87].

Es wurden ebenso Messungen durchgeführt, bei denen sowohl der Einfluss eines ATP-kompetitiven Inhibitors (CX-4945) [178] als auch eines Substratpeptids (RRRDDDSDDD) [199] auf die Bindung von CF-Ahx-Pc an *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* untersucht wurde. In Anwesenheit beider Substanzen kam es zu keiner Veränderung der FA über den kompletten Konzentrationsbereich. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Interaktion von CF-Ahx-Pc und *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* durch beide Substanzen nicht gestört wird.

Vor der Verwendung des FA-Assays für Konkurrenzexperimente und der damit einhergehenden Bindungsstudien mit Inhibitoren wurde der Z'-Faktor bestimmt. Dieser gibt Auskunft über die Eignung des von uns entwickelten FA-Assay für ein Hochdurchsatzscreening. Der Z'-Faktor ist dabei ein Maß der statistischen Effektgröße und gibt an, ob das in einem Assay gemessene Signal-Rausch-Verhältnis ausreichend ist. Hierzu werden, wie in Gl. 32 (s. Kapitel 4.9.4) dargestellt, als Parameter die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Positiv- und Negativkontrolle herangezogen. In der vorliegenden Arbeit dienten als Positivkontrolle Messungen in Anwesenheit von 3 μ M *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* und von 100 nM CF-Ahx-Pc. Für die Negativkontrolle wurde das unmarkierte zyklische Peptid Pc in einer Konzentration von 30 μ M zugesetzt, um sicherzustellen, dass CF-Ahx-Pc vollständig von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* verdrängt wurde. Der Z'-Faktor wurde mit und ohne 50-minütige Präinkubation bestimmt. Die berechneten Z'-Faktoren betrugen 0,716 (50 min) und 0,694 (0 min) und zeigten keine statistische Abweichung voneinander ($p > 0,05$). Der Assay wäre damit grundsätzlich an beiden Messzeitpunkten für ein Hochdurchsatzscreening geeignet. Als optimal gelten Z'-Faktoren von 0,5–1. Die hier bestimmten Z'-Faktoren von etwa 0,7 stimmen in etwa mit den in anderen Kinaseassays vorgefundenen Z'-Faktoren überein [7]. Die Durchführung des in der vorliegenden Arbeit genutzten Assays mit 96-well-Platten und einem Assayvolumen von 200 μ l ist selber jedoch nicht für ein HTS geeignet, denn durch das größere Testvolumen werden zu große Mengen an Protein und Testsubstanzen verbraucht. Für ein HTS ist es von Vorteil, die genutzten Volumina zu verringern und das Verfahren zu automatisieren, um mehrere Substanzen parallel testen zu können. Zusätzlich würde sich so auch der Substanzverbrauch verringern. Mit dem in dieser Arbeit ermittelten Wert sollte lediglich die grundsätzliche Eignung festgestellt werden. Bestimmt wurde der Z'-Faktor hinsichtlich eines geplanten Screenings in der Screening-Unit des Leibniz-Instituts für Molekulare Pharmakologie in Berlin.

6.3.2 MST-Assay

Bei der Microscale-Thermophorese (MST) handelt es sich noch um eine relativ neue gerätegestützte Messmethode zur Untersuchung von PPIs [156,157,200]. Sie beruht auf der

Thermophorese von Substanzen innerhalb eines Temperaturgradienten [158,201]. Genauer zu den theoretischen Grundlagen dieser Methode ist in Kapitel 3.3 zu finden. Die MST wurde gewählt, da sie nur einen sehr geringen Probenverbrauch hat – die Kapillaren weisen ein Probenvolumen von weniger als 4 µl auf – und eine Untersuchung der Interaktion von CK2α mit CK2β erlaubt [156]. Im Falle des FA-Assays wird dagegen nur die Beeinflussung eines Teils der CK2α-CK2β-Interaktionsfläche mittels eines CK2β-nachahmenden Peptids untersucht [7]. Dies hat den Nachteil, dass Inhibitoren, die nicht genau mit diesem kleinen Teil der Interaktionsfläche interagieren, aber dennoch ein CK2β-kompetitives Verhalten zeigen, nicht als Inhibitoren der CK2α/CK2β-Interaktion identifiziert werden können. Aufgrund des geringen Probenvolumens war die MTS auch dazu geeignet, die K_D -Werte der in HEK293-EBNA-Zellen exprimierten katalytischen CK2-Untereinheiten mit CK2β zu bestimmen, da die geringen Ausbeuten nach Expression und Aufarbeitung nicht für eine Messung im FA-Assay ausreichten. Für die MST-Messungen wurden pro Messung lediglich 20 µl der jeweils höchsten Konzentration der CK2α-Untereinheiten benötigt. Dies entspricht bei den CK2α-Untereinheiten etwa 4–10 µg pro Messung. Im Vergleich hierzu werden für eine Messung im FA-Assay etwa 1,4 mg Protein benötigt.

Um feststellen zu können, ob die MST valide Ergebnisse liefert, wurden zuerst jeweils die bereits literaturbekannten K_D -Werte der *hsCK2α*¹⁻³³⁵ und *hsCK2α*^{C336S} mit *hsCK2β*¹⁻¹⁹³ bestimmt. Hierzu wurden die Proteine genutzt, welche in *E. coli* exprimiert wurden. Für die Messungen wurde die *hsCK2β*¹⁻¹⁹³ mit Hilfe des NT™-Protein-Labeling-Kit RED-NHS der Firma *Nanotemper* mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Markierung erfolgt dabei randomisiert über eine Reaktion primärer Amine (Lysin-Seitenketten) mit dem NHS-Fluoreszenzfarbstoff. Dies hat zur Folge, dass Effekte, welche durch eine lokalisierte Markierung entstehen können, vermieden werden [157].

Die K_D -Graphen für beide Proteine sind in Abb. 54 in Kapitel 5.4.1 dargestellt. Die K_D -Werte für beide CK2α-Untereinheiten sind in Tab. 35 in Kapitel 5.4.1 aufgeführt. Die Affinität der *hsCK2α*^{C336S} zu *hsCK2β*¹⁻¹⁹³ ist dabei um den Faktor 11 schwächer als die der *hsCK2α*¹⁻³³⁵ zu *hsCK2β*¹⁻¹⁹³. In Kapitel 5.3.1 wurden bereits die K_D -Werte der *hsCK2α*¹⁻³³⁵ und *hsCK2α*^{C336S} mit dem CK2β-nachahmenden Peptid CF-Ahx-Pc im FA-Assay im Vergleich zu den K_D -Werten der beiden Proteine mit *hsCK2β*¹⁻¹⁹³ aus ITC-Messungen diskutiert. Auch bei diesen beiden Methoden ergab sich eine um den Faktor 10–12 schwächere Affinität der *hsCK2α*^{C336S} zu *hsCK2β*¹⁻¹⁹³. Im Falle der MST-Messungen zeigte die *hsCK2α*^{C336S} aus *E. coli* ebenfalls eine um den Faktor 11 schwächere Affinität zur CK2β als die *hsCK2α*¹⁻³³⁵. Dies wurde bereits bei ITC-Messungen von *Bischoff et al.* [87] und ebenfalls in einer Arbeit von *Olsen et al.* [202] beobachtet. Eine genauere Erklärung hierfür fehlt aber noch. Die hier mittels MST-Assay gefundenen K_D -Werte zeigten eine gute Übereinstimmung mit den in der Literatur

angegebenen Werten für diese Interaktion, welche bei 3,7 nM für $hsCK2\alpha^{1-335}$ und 45,5 nM für $hsCK2\alpha^{C336}$ liegen [7,87].

Mit Hilfe der K_D -Wert-Bestimmung der Interaktion von $hsCK2\alpha^{1-335}$ oder $hsCK2\alpha^{C336S}$ mit $hsCK2\beta^{1-193}$ konnte gezeigt werden, dass die MST als Messmethode zur Untersuchung dieser Interaktion geeignet ist.

6.4 Bindungsstudien mit dem zyklischen Peptid Pc und seiner Derivate

Nach der Etablierung beider Assays konnte mit der Durchführung von Konkurrenzexperimenten begonnen werden. Die Konkurrenzexperimente wurden genutzt, um Inhibitoren zu suchen, welche die Interaktion der beiden katalytischen CK2-Untereinheiten (MST) und die Interaktion von $hsCK2\alpha^{1-335}$ mit CF-Ahx-Pc (FA) verhindern. Hierzu wurde zunächst mit dem zyklischen Peptid Pc selber begonnen, dessen CK2 β -kompetitives Verhalten bereits in der Literatur beschrieben wurde [8]. Dieses wurde im FA-Assay auch hinsichtlich seiner CK2 β -kompetitiven Wirkung bei der Interaktion der paralogen $hsCK2\alpha^{C336S}$ und CF-Ahx-Pc untersucht. Die Synthese des zyklischen Peptids Pc wurde in der Diplomarbeit von *Eungyoung Yoo* durchgeführt.

Die zugehörigen Graphen für die Messungen im FA-Assay für beide Messzeitpunkte mit 3 μ M $hsCK2\alpha^{1-335}$ sowie 100 nM CF-Ahx-Pc und titrierten Konzentrationen an Pc sind unter Abb. 45 in Kapitel 5.3.2 zu finden. Die ermittelten IC_{50} -Werte zu beiden Messzeitpunkten zeigten keinen signifikanten Unterschied ebenso wie die daraus berechneten K_i -Werte. Die Werte hierzu sind in Tab. 30 in Kapitel 5.3.2 aufgeführt. Der K_i -Wert nach 50 min zeigte einen signifikanten Unterschied zu einem von *Dr. J. Hochscherf* in ITC-Experimenten ermittelten K_D -Wert (Abb. 46 und Tab. 31 in Kapitel 5.3.2). Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied wird später in diesem Kapitel erläutert.

Für die paraloge $hsCK2\alpha^{C336S}$ wurde ebenfalls der IC_{50} -Wert mit Pc ohne Präinkubation bestimmt. Aufgrund der geringeren Affinität zum Substratpeptid des Assays (s. Kapitel 5.3.1) wurde mit einer Konzentration von 30 μ M $hsCK2\alpha^{C336S}$ gemessen. Die Messkurve für die Bestimmung des IC_{50} -Wertes ist in Abb. 47 im Kapitel 5.3.3 zu sehen. Der berechnete K_i -Wert für die Interaktion mit $hsCK2\alpha^{C336S}$ lag in diesem Fall bei 3,50 μ M und dabei etwa um Faktor 6 höher als der von $hsCK2\alpha^{1-335}$ berechnete K_i -Wert. Zusammengefasst zeigt $hsCK2\alpha^{C336S}$ im Vergleich zu $hsCK2\alpha^{1-335}$ nicht nur eine geringere Affinität gegenüber CK2 β [87], sondern auch gegenüber den CK2 β -nachahmenden Peptiden Pc und CF-Ahx-Pc.

Das MST-Experiment für Pc wurden in Anlehnung an ein Experiment von Raaf *et al.* [131] durchgeführt. Hierbei wurden ITC-Messungen zur CK2 α /CK2 β -Interaktion in Anwesenheit von

20 μM Pc durchgeführt. Diese Konzentration wurde ebenfalls für die MST-Messungen verwendet. Für die beiden CK2-Untereinheiten wurden die gleichen Konzentrationen wie zur Bestimmung des K_D -Wertes der CK2 α /CK2 β -Interaktion eingesetzt. Die Ergebnisse für den bestimmten K_D -Wert der CK2 α /CK2 β -Interaktion in Anwesenheit von Pc und der daraus mit Gl. 33 (s. Kapitel 4.10.3) berechnete K_i -Wert sind in Tab. 37 in Kapitel 5.4.3 aufgeführt. Es konnte ein ähnlicher K_i -Wert im niedrigen mikromolaren Bereich wie im FA-Assay bestimmt werden.

Im nächsten Schritt sollten nun neue Derivate des zyklischen Peptids Pc entwickelt werden. Als Basis diente hier die Arbeit von *Laudet et al.*, welche zeigt, dass das Phenylalanin 190 der CK2 β wichtig für die Interaktion der CK2-Untereinheiten ist. [8] Dies wurde durch eine erste Kristallstruktur von CK2 α mit dem zyklischen Peptid Pc gestützt [131]. Weiterhin wurde in dieser Arbeit dargelegt, dass die Interaktion von CK2 α und Pc auf einem Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen beruht. Diese Wasserstoffbrückenbindungen sind sowohl direkter als auch durch Wasser vermittelter Natur. Mit Hilfe der Kristallstruktur konnte insbesondere die Interaktion eines Wassermoleküls mit dem für die CK2 α /CK2 β -Interaktion essentiellen Phenylalanin 190 bzw. dessen Meta-Position am Benzylring belegt werden (s. Abb. 62) [7,131].

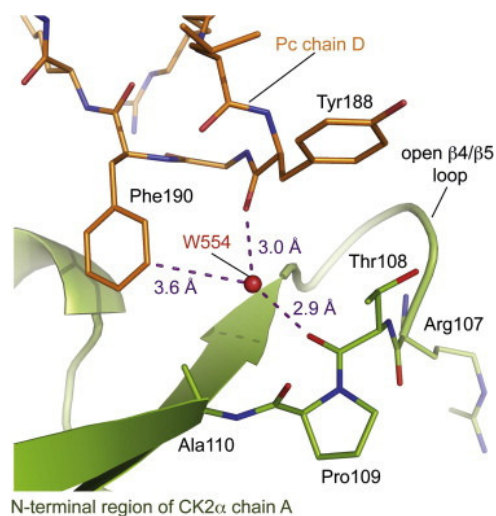


Abb. 62 Interaktion des Phe 190 von Pc mit CK2 α mittels eines Wassermoleküls:

Vergrößerte Darstellung der Kristallstruktur der CK2 α im Komplex mit dem zyklischen Peptid Pc: Interaktion des Phe 190 (meta-Position des Benzylrings) von Pc und der CK2 α über eine durch ein Wassermolekül (W554) vermittelte Wasserstoffbrückenbindung [7]. Mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

Diese Interaktion wurde in der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. Neundorff* als Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer zyklischer Peptide zugrunde gelegt. Die Synthese der Derivate von Pc erfolgte im Rahmen der Bachelor- und Masterarbeit von *Dirk Lindenblatt*. Hierzu wurden vor der Synthese molekulare Dockingexperimente neuer Derivate, mit in meta-Position derivatisierten Phenylalaninen, im Arbeitskreis von *Prof. Dr. Helms* in Saarbrücken

durchgeführt. Die in der vorliegenden Arbeit getesteten Pc-Derivate Cl-Pc und I-Pc zeigten dabei eine negativere vorhergesagte Bindungsenergie als Pc selber.

Die Untersuchung der synthetisierten Pc-Derivate erfolgte dabei in Anwesenheit von 1 μM CF-Ahx-Pc. Daher wurden diese Messungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit und ohne Präinkubation in Anwesenheit von 3 μM $hsCK2\alpha^{1-335}$ und 100 nM CF-Ahx-Pc wiederholt [7]. Die IC_{50} -Werte (mit Ausnahme des Cl-Pc) sowie daraus berechneten K_i -Werte zeigten dabei keine signifikanten Unterschiede zu beiden Messzeitpunkten und sind in Tab. 31 in Kapitel 5.3.2 aufgeführt.

Wie schon die mit CF-Ahx-Pc ermittelten K_D -Werte von $hsCK2\alpha^{1-335}$ und $hsCK2\alpha^{C336S}$ wurden auch die hier bestimmten Werte mit ITC-Experimenten verglichen, welche von *Dr. J. Hochscherf* durchgeführt wurden. Die Graphen der ITC-Messungen mit den zyklischen Peptiden sowie die daraus ermittelten K_D -Werte sind in Abb. 46 und in Tab. 31 in Kapitel 5.3.2 aufgeführt. Wie bereits unter 5.3.2 erwähnt, kam es hierbei zu einem signifikanten Unterschied der Werte aus dem FA-Assay und der in ITC-Experimenten bestimmten K_D -Werte ($P < 0,05$, one-way ANOVA mit Dunett's multiplem Vergleichstest). Deshalb kam die Vermutung auf, dass der FA-Assay über die Inkubationszeit nicht thermostabil ist. Die Präinkubation wird normalerweise genutzt, um die Einstellung eines Gleichgewichts zwischen Target-Protein, Kompetitor und der Fluoreszenzprobe zu ermöglichen [203]. In Vorexperimenten von *Dr. J. Hochscherf* wurde ein Anstieg des K_D -Wertes von CK2 α und CF-Ahx-Pc beobachtet, der nach 30 min ein Plateau erreichte. Aus diesem Grund wurde zunächst die Inkubationszeit von 50 min gewählt. Der signifikante Unterschied der K_i -Werte des FA-Assay und der in ITC-Experimenten bestimmten K_D -Werte führte jedoch zu dem Schluss, dass die Präinkubation doch einen Einfluss auf die Ergebnisse des FA-Assay hat. Während sich das Gleichgewicht zwischen CK2 α , Pc oder eines seiner Derivate sowie CF-Ahx-Pc schnell einstellt, scheint der FA-Assay nicht thermostabil zu sein. Die Thermoinstabilität ist wahrscheinlich auf die Verminderung der CK2 α -Konzentration zurückzuführen. Hierfür gibt es drei Indikatoren: zum einen den erhöhten K_D -Wert von CK2 α und CF-Ahx-Pc (s. Tab. 29 Kapitel 5.3.1), zum anderen die Reduzierung der IC_{50} -Werte von Pc und seiner Derivate nach 50 min Inkubation und zuletzt die verringerten FA-Werte nach 50 min (nicht gezeigt) [7]. Zur Erklärung der wahrscheinlich verminderten CK2 α -Konzentration können Ergebnisse aus der Kristallstruktur der CK2 α im Komplex mit Pc sowie aus mehreren ungebundenen CK2 α - und CK2 α^{1-335} -Kristallstrukturen herangezogen werden [52,131,174]. Die Kristallstruktur der CK2 α im Komplex mit Pc zeigte, dass ein flexibles Element ($\beta 4/\beta 5$ -Schleife) der CK2-Bindungsstelle eine ähnliche Konformation wie im CK2-Holoenzym einnimmt [131]. Die Betrachtung der Kristallstrukturen von ungebundener CK2 α und CK2 α^{1-335} zeigt, dass die $\beta 4/\beta 5$ -Schleife eine Art geschlossene Konformation einnimmt, die nicht mit der Bindung von CK2 β kompatibel ist [52,174]. Aufgrund der hohen Plastizität der $\beta 4/\beta 5$ -Schleife könnten schon kleinste strukturelle Änderungen durch

eine beginnende Denaturierung der CK2 α zu der geschlossenen Konformation führen. Hierdurch würde die Konzentration an CK2 α , welche für die Bindung von CF-Ahx-Pc und Pc oder eines seiner Derivate tatsächlich zur Verfügung steht, verringert. Bei Experimenten mit Differential-Scanning-Kalorimetrie konnte gezeigt werden, dass bei 37 °C bereits die thermale Denaturierung der CK2 α einsetzt [52,132]. Dies entspricht genau der im Assay verwendeten Temperatur. Die somit wahrscheinliche Denaturierung der CK2 α während der 50-minütigen Präinkubation könnte deswegen zu einer niedrigeren Konzentration von aktiv am Assay beteiligtem Protein führen. [7].

In MST-Experimenten wurden ebenfalls die K_i -Werte zweier Derivate des zyklischen Peptids Pc bestimmt (s. Kapitel 5.4.3). Anstelle des Cl-Pc wurde in diesen Studien der K_i -Wert des Br-Pc bestimmt. Entsprechende Bestimmungen im FA-Assay für dieses Peptid wurden in der Masterarbeit von *Dirk Lindenblatt* durchgeführt. Die MST-Experimente erfolgten, wie zuvor für das zyklische Peptid Pc, ebenfalls in Anlehnung an ein Experiment von *Raaf et al* [131]. Der K_D -Wert der CK2 α /CK2 β -Interaktion wurde in Anwesenheit einer konstanten Konzentration von 20 μ M des jeweiligen Derivates ermittelt. Die Ergebnisse dazu sind in Tab. 37 in Kapitel 5.4.3 zu finden. Mit Hilfe des K_D -Werts der Interaktion von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* und *hsCK2 β ¹⁻¹⁹³* in Abwesenheit der zyklischen Peptide (3,28 nM) wurden daraus mit Hilfe von Gl. 33 (s. Kapitel 4.10.3) die jeweiligen K_i -Werte berechnet. Die berechneten Werte sind ebenfalls in Tab. 37 aufgeführt. Die mit der MST ermittelten K_i -Werte liegen etwas höher als die im FA-Assay bestimmten. Im FA-Assay interagierten die zyklischen Peptide jedoch auch nicht mit der gesamten CK2 β -Untereinheit, sondern nur mit dem fluoreszenzmarkierten CK2 β -nachahmenden CF-Ahx-Pc. Der K_D -Wert für die Interaktion von CK2 α und CK2 β liegt deutlich niedriger als der von CK2 α und CF-Ahx-Pc. Die Affinität der Bindung, welche gestört werden soll, ist somit bereits viel höher. Dies könnte erklären, warum die K_i -Werte für die zyklischen Peptide höher liegen als im FA-Assay. Weiterhin hat das CK2-Holoenzym eine relativ lange Halbwertszeit von 38 min [8]. Deswegen waren die MST-Experimente auch so konzipiert, dass nicht die Dissoziation des bereits bestehenden CK2-Holoenzym, sondern die Zusammenlagerung der beiden CK2-Untereinheiten gemessen wurde. Für Dissoziationsexperimente müssten die zyklischen Peptide über einen längeren Zeitraum mit dem CK2-Holoenzym präinkubiert werden, damit eine mögliche Dissoziation bestimmt werden könnte.

Zusammenfassend konnte mit beiden Messmethoden das CK2 β -kompetitive Verhalten des zyklischen Peptids reproduziert werden. Weiterhin konnten neue CK2 β -kompetitive Derivate des Pc sowohl im FA-Assay als auch in der MST identifiziert werden. Eine Weiterentwicklung hinsichtlich ihrer inhibitorischen Potenz wäre von großem Interesse, gerade im Hinblick auf mögliche Studien in einem zellulären Assay. Die Zyklisierung der in dieser Arbeit synthetisierten Proteine erfolgte über die Oxidation zweier Cysteine (Disulfidbrücke). Für einen

Einsatz bei intrazellulären Untersuchungen müsste die Zyklisierung über eine andere Methode erfolgen, da die Disulfidbrücke mit hoher Wahrscheinlichkeit in Zellen reaktiv aufgelöst werden würde.

6.5 Bindungsstudien mit Inhibitoren des Podophyllotoxin Indolo-Analoga Typs

Die Gruppe von *Dr. Claude Cochet* (Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble) hat, neben den CK2 β -nachahmenden Peptiden, mittels Screening einer Substanzbibliothek weitere Inhibitoren der CK2 α /CK2 β -Interaktion gefunden, welche auf dem Naturstoff Podophyllotoxin (s. Abb. 63) beruhen [133].

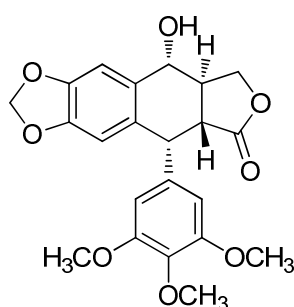


Abb. 63 Struktur des Naturstoffs Podophyllotoxin

Podophyllotoxin selbst ist bekannt für seine antimittotische Wirkung. Es ist ein starkes Spindelgift, welches die Bildung von Mikrotubuli durch die Bindung an Tubulin verhindert. Dies hat letztendlich eine Blockierung der Zellteilung zur Folge. Die identifizierten Inhibitoren der CK2 α /CK2 β -Interaktion sind Indol-Analoga dieses Naturstoffes, wobei die Verbindung W16 (s. Abb. 51 Kapitel 5.3.6) mit einem IC₅₀-Wert von 30–40 μ M der potenteste Inhibitor der Serie war. W16 hemmt ebenfalls die Kinaseaktivität der CK2 α mit einem IC₅₀ von 20 μ M. Mit steigender Konzentration von CK2 β konnte die Inhibition der Kinaseaktivität wieder umgekehrt werden. Ebenso war eine Verminderung der Inhibition mit steigender Pc-Konzentration zu beobachten. *Laudet et al.* [133] postulierten daher, dass W16 in oder nahe der hydrophoben Bindungstasche der CK2 α , welche auch zum Interaktionsinterface der CK2 α /CK2 β Interaktion zählt, bindet. Weiterhin folgerten sie daraus, dass W16 dort wahrscheinlich als allosterischer Inhibitor fungiert. Eine genauere Aussage über den Bindungsmodus des W16 wurde jedoch nicht getroffen [133]. In dieser Arbeit wurden W16 und W16-Analoga mit Hilfe beider Assays untersucht. Die Ergebnisse des Screening mit dem FA-Assay sind in Tab. 32 in Kapitel 5.3.6 aufgeführt. Es zeigte sich, dass keine der getesteten Substanzen bei Konzentrationen von 1–100 μ M in der Lage war, die Interaktion von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* und CF-Ahx-PC deutlich zu hemmen. Lediglich die Substanzen WMS66-03 und WMS66-06 zeigten einen konzentrationsabhängigen Abfall der Fluoreszenz-Anisotropie.

Parallel zur Testung der Substanzen im FA-Assay erfolgten auch Messungen mit Hilfe der MST, um das CK2 β -kompetitives Verhalten der Podophyllotoxin-Indolo-Analoga zu untersuchen. Da die Substanzen im FA-Assay keine Hemmung der Interaktion von *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵ und CF-Ahx-Pc zeigten (s. Tab. 32, Kapitel 5.3.6), lag die Vermutung nahe, dass diese Substanzen nicht mit der gleichen Bindungstasche wie CF-Ahx-Pc interagieren. In Anlehnung an die Arbeit von *Laudet et al.* [133] wurde in den MST-Messungen eine Substanzkonzentration von 100 μ M eingesetzt. Zur Verbesserung der Löslichkeit von W16 und seiner Derivate wurden diese in Anwesenheit von 1 % DMSO getestet. Für die anschließende Berechnung der K_i -Werte aus den so bestimmten K_D -Werten wurde der K_D -Wert für die Interaktion der *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵ mit fluoreszenzmarkierter *hsCK2 β* ¹⁻¹⁹³ in Abwesenheit des Kompetitors unter den gleichen Bedingungen bestimmt. Dieser lag mit 12,1 nM etwas höher als der ohne DMSO bestimmte K_D -Wert (3,23 nM). Es scheint, dass DMSO einen Einfluss auf die CK2 α /CK2 β -Interaktion hat. Wie sich DMSO genau auf die Proteine auswirkt, wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Jedoch wurde in einer Studie gezeigt, dass bereits geringe Mengen an DMSO einen Einfluss auf die Denaturierung, die Aggregation, den Abbau und das Bindungsverhalten von Proteinen haben [204].

Es war geplant, alle elf Substanzen aus der Gruppe der Podophyllotoxin-Indol-Analoga mit Hilfe der MST zu untersuchen. Für vier dieser Substanzen konnte kein K_D -Wert der CK2 α /CK2 β -Interaktion in Anwesenheit der Substanz bestimmt werden. Grund hierfür war ein zu starkes Aggregations- bzw. eventuell auch Denaturierungsverhalten der Proteine, welches in den MST-Messungen sofort zu beobachten ist. Aggregierte Moleküle oder Proteine werden durch den konvektiven Fluss in und aus dem punktuell erwärmten Bereich transportiert. Hierdurch kommt es zu Schwankungen im MST-Signal, welche sich als Wölbungen zeigen. [157] Vier weitere Substanzen zeigten lediglich geringe Veränderungen des K_D -Werts der CK2 α /CK2 β -Interaktion, welche in K_i -Werten von über 100 μ M resultierten (s. Tab. 38, Kapitel 5.4.4). W16 zeigte einen K_i -Wert von 26,1 μ M, der vergleichbar mit dem von *Laudet et al.* [133] ermittelten IC₅₀-Wert ist. Eine weitere Substanz, WMS 66-11, bei der es sich um ein Konfigurationsisomer der Substanz W16 handelt, zeigte einen K_i -Wert von 23,7 μ M und die im FA-Assay potenteste Substanz, WMS 66-04, einen K_i -Wert von 64,7 μ M. Interessanterweise konnte für ein weiteres Konfigurationsisomer der Substanz W16 kein K_D -Wert bestimmt werden, da ein zu starkes Aggregationsverhalten während der MST-Messungen zu beobachten war. Dies machte eine Auswertung der Messungen unmöglich [133]. Alle anderen Veränderungen am Grundgerüst der Podophyllotoxin-Indolo-Analoga zeigten keine Verbesserung in der Inhibition der CK2 α /CK2 β -Interaktion. Es scheint so, dass für diese Substanzklasse mit der Grundstruktur des W16 bis jetzt der potenteste Inhibitor gefunden werden konnte, da sein Konfigurationsisomer einen ähnlichen K_i -Wert zeigt. Für weitere Struktur-Wirkungs-Analysen sollte also direkt an W16 weitergearbeitet werden.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass die Substanzen wohl eher nahe der hydrophoben Bindungstasche der CK2 α , welche auch zum Interaktionsinterface der CK2 α /CK2 β -Interaktion zählt, binden und nicht direkt in dieser. Andernfalls sollten die Substanzen ebenfalls im FA-Assay in der Lage sein, CF-Ahx-PC kompetitiv zu verdrängen [133]. Der FA-Assay scheint für diese Substanzen nicht die geeignete Messmethode zu sein. Mit Hilfe der MST lässt sich das CK2 β -kompetitive Verhalten dieser Substanzgruppe jedoch nachweisen.

6.6 Bindungsstudien mit Inhibitoren des Indeno[1,2-*b*]indol-Typs

Die Substanzklasse der Indeno[1,2-*b*]indole wurde bereits als neuartige Klasse von ATP-kompetitiven Inhibitoren der Kinaseaktivität des CK2-Holoenzym identifiziert [134–136]. Die Strukturen der getesteten Inhibitoren sind in Abb. 51 in Kapitel 5.3.7 zu sehen. Ähnlich wie bei den Podophyllotoxin-Indol-Analoga wurden diese Substanzen mit beiden Assays untersucht.

Bei einem ersten Screening im FA-Assay zeigten die meisten der Substanzen zumindest eine leichte konzentrationsabhängige Inhibition der CK2 α /CF-Ahx-Pc-Interaktion. Ermittelt wurde hier die prozentuale Restaktivität der Interaktion von CK2 α und CF-Ahx-Pc in Anwesenheit der Substanzen. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tab. 33 in Kapitel 5.3.7 aufgeführt. Fünf der getesteten Substanzen waren bei einer Konzentration von 100 μ M in der Lage, mit CF-Ahx-Pc um die Bindung an *hs*CK2 α ¹⁻³³⁵ zu konkurrieren. Zwei Substanzen zeigten kaum bis keine Inhibition der CK2 α /CF-Ahx-Pc-Interaktion. Die Restaktivität der Interaktion lag bei beiden Substanzen über 90 %.

Zwei weitere Substanzen hingegen führten zu einer wesentlich geringeren Restaktivität von 35–45 % der Interaktion von *hs*CK2 α ¹⁻³³⁵ und CF-Ahx-Pc. Diese beiden wurden für weiterführende Untersuchungen ausgewählt. Es handelte sich hierbei um die Substanzen CM3041A und CM3094A. Die Strukturen der beiden Substanzen sind in Abb. 52 in Kapitel 5.3.7 zu finden. Die Ergebnisse der IC₅₀-Bestimmung sowie die daraus berechneten K_i-Werte sind in Tab. 34 in Kapitel 5.3.8 aufgeführt. Aufgrund von Löslichkeitsproblemen konnte im FA-Assay jedoch keine Sättigung der Kurven erreicht werden. Die Potenz, die CK2 α /CF-Ahx-Pc-Interaktion zu stören, war bei beiden Inhibitoren mit IC₅₀-Werten im hohen mikromolaren Bereich nicht sehr ausgeprägt. Beide Substanzen zeigten auch bei den MST-Messungen ein CK2 β -kompetitives Verhalten mit K_i-Werten von 44,9 μ M (CM3041A) und 99,7 μ M (CM3094A) und somit einer stärkeren Inhibition als in den FA-Experimenten. Im Vergleich zu den zyklischen Peptiden mit K_i-Werten im niedrig-mikromolaren Bereich (s. Kapitel 5.3.2 und 5.4.3) und den Podophyllotoxin-Indol-Analoga mit K_i-Werten im mittleren mikromolaren Bereich (s. Kapitel 5.4.4) liegen die hier ermittelten K_i-Werte etwas höher. Neben den Substanzen CM3041A und CM3094 ließ auch die Substanz AF10 ein CK2 β -kompetitives Verhalten in den MST-Messungen erkennen. AF10 erhöhte dabei den K_D-Wert

der CK2 α -CK2 β -Interaktion am stärksten, nämlich von 12,1 nM auf 55,6 nM. Daraus resultierte ein K_i -Wert von 29,9 μ M. Für alle drei Substanzen wäre eine Weiterentwicklung und Optimierung der inhibitorischen Wirkung mittels Struktur-Wirkungs-Analysen von Interesse, da sie, wie bereits erwähnt, ebenfalls an der ATP-Bindungsstelle der CK2 α angreifen [134–136]. Sind die Substanzen in der Lage, sowohl ATP an der Bindung zu hemmen als auch die Interaktion der CK2 α und CK2 β , könnte man von sogenannten dualen Inhibitoren sprechen. Solche dualen Inhibitoren begünstigen die Entwicklung selektiverer Proteinkinaseinhibitoren im Vergleich zu rein ATP-kompetitiven Inhibitoren. Bei ATP-kompetitiven Inhibitoren stellt die Selektivität das größte Hindernis dar, da die ATP-Bindungstasche aller Proteinkinasen eine hohe strukturelle Homologie aufweist und in ihrer aktiven Form stark konserviert ist [30,32]. Ein Beispiel für solch einen dualen Inhibitor ist DRB (s. Kapitel 1.5.3).

Die restlichen Indeno[1,2-*b*]indole zeigten im FA-Assay keinerlei Vermögen, die CK2 α /CF-Ahx-Pc-Interaktion zu stören. Bei den MST-Messungen kam es hingegen zu einer interessanten Beobachtung: Bis auf Substanz AF9, für welche aufgrund von zu starkem Aggregationsverhalten kein K_D -Wert bestimmt werden konnte, kam es bei allen weiteren Substanzen zu einer Verringerung des K_D -Wertes der CK2 α /CK2 β -Interaktion. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass diese Substanzen möglicherweise die Interaktion zwischen den beiden CK2-Untereinheiten verstärken, obwohl sie gleichzeitig in der Lage sind, die enzymatische Aktivität der CK2 α zu hemmen [134–136]. Das Indeno[1,2-*b*]indol, welches den K_D -Wert der CK2 α /CK2 β -Interaktion am stärksten verringerte (von 12,1 nM auf 1,79 nM) ist die Substanz 6b. Der zugehörige Graph ist in Abb. 60 in Kapitel 5.4.5 zu sehen. Dabei fällt auf, dass sich der Verlauf der K_D -Kurve im Vergleich zu allen anderen Messungen verändert.

In der Literatur sind bereits Substanzen bekannt, welche in der Lage sind, die isolierte CK2 α zu inhibieren, jedoch in Anwesenheit von CK2 β für eine Stimulation der Aktivität sorgen, so dass die beobachtete Phosphorylierung gesteigert ist. Hierzu zählt beispielsweise Polylysin (s. Abb. 64).

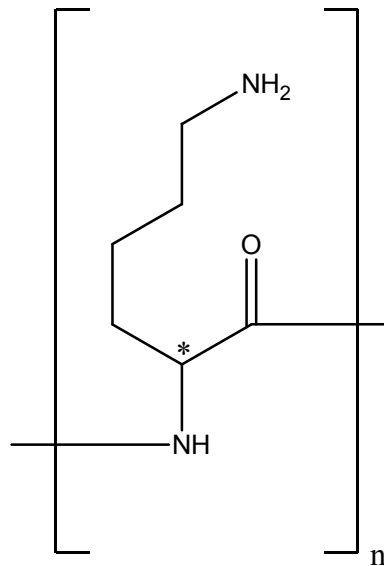


Abb. 64 Strukturformel des Polylysins

In der Arbeit von *Romero-Oliva et al.* [205] zeigte Polylysine an isolierter CK2 α bis zu 80 % Inhibition für die Phosphorylierung von Casein. Dieser Effekt war bei niedrigen Casein-Konzentrationen von 166 pmol zu beobachten. Bei höheren Casein-Konzentrationen verschwindet der inhibierende Effekt wieder. Bei den Untersuchungen in Anwesenheit von CK2 β konnte allerdings demonstriert werden, dass Polylysine in diesem Fall für eine Stimulation der Phosphorylierung sorgt. Bei der Phosphorylierung von Casein in Anwesenheit von CK2 β ohne Polylysine wurde bereits eine 5,7-fache Steigerung der Aktivität gemessen. Wird Polylysine hinzugegeben, ist der beobachtete Effekt noch ausgeprägter (242-fache Steigerung der Phosphorylierung von Casein). Der beobachtete Effekt bezieht sich allerdings auf die katalytische Aktivität der CK2 α [205]. Ähnliches wurde von *Bidwai et al.* [99] bei der CK2-abhängigen Phosphorylierung von Calmodulin beobachtet. Calmodulin wird nur in Anwesenheit von Polylysine durch das Holoenzym phosphoryliert. Dieser Effekt kann durch Spermin wieder aufgehoben werden [206,207]. Für Spermin und Spermidine wurde bereits 1977 von *Mäenpää et al.* [208] festgestellt, dass sie ebenfalls die CK2 aktiviert. Dieser Effekt wurde von *Cochet et al.* [209] bestätigt, die zeigten, dass durch Spermin, bei niedrigen Heparinkonzentrationen, die Inhibition von Heparin aufgehoben werden kann. In Abb. 65 ist ein möglicher Mechanismus für diese Interaktion zu sehen, welcher von *Leroy et al.* [210] postuliert wird. Das Holoenzym wird durch vier elektrostatische Interaktionen stabilisiert. Diese kommen zwischen einer positiv geladenen Region der CK2 α und der negativ geladenen Region der Polyamin-Bindungsstelle der CK2 β zustande. Hierdurch kommt es zu einer sterischen Hinderung, welche eine limitierte Bindung von einigen Substraten zur Folge hat. Wird das Holoenzym einer erhöhten Spermin- oder Magnesiumkonzentration ausgesetzt, wird die Polyamin-Bindungsstelle freigegeben und die sterische Hinderung aufgehoben. Dadurch

wird die Kinaseaktivität stimuliert, und das Proteinsubstrat kann leichter binden. Kleine Peptidsubstrate können nun mit der Polyamin-Bindungsstelle der CK2 β interagieren.

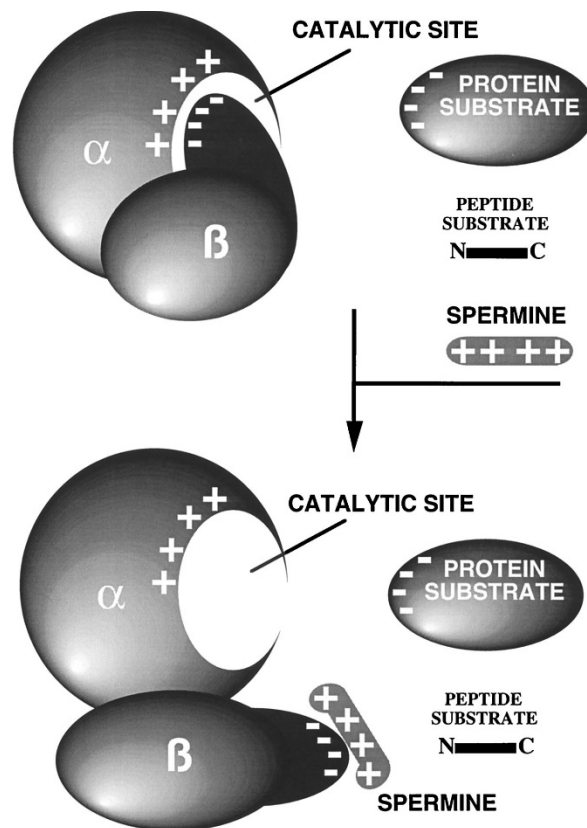


Abb. 65 Mechanismus für die Stimulation von CK2 durch Polyamine:

Postulierter Mechanismus für eine mögliche Interaktion von Polyaminen mit dem CK2-Holoenzym über die regulatorische Untereinheit CK2 β . Die Bindung der Polyamine an die CK2 β führt zu einer Konformationsänderung, welche das katalytische Zentrum zugänglich macht. Mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology [50,210].

Es gibt bis jetzt keinen genauen Hinweis, wieso ein Großteil der hier untersuchten Substanzen die CK2 α /CK2 β -Interaktion auf eine gewisse Weise aktivieren. Hierzu müssten weitere Untersuchungen unternommen werden. Die hier untersuchten Indeno[1,2-*b*]indole wurden in Hinsicht auf ihre Inhibition jedoch bereits am CK2-Holoenzym sowie an Tumorzelllinien getestet und zeigten dort, wie bereits erwähnt, eine potente Inhibition [210]. Für eine Weiterentwicklung der Inhibitoren wäre es von Interesse zu klären, ob diese im Komplex mit dem CK2-Holoenzym eine weitere Bindungsstelle, neben der ATP-Bindungsstelle, besetzen.

Wären die Substanzen in der Lage, sowohl ATP an der Bindung zu hemmen als auch die Interaktion von CK2 α mit CK2 β , könnte von sogenannten dualen Inhibitoren gesprochen werden. Ein Beispiel für solch einen dualen Inhibitor ist DRB (s. Kapitel 1.5.3).

6.7 Bestimmung der K_D -Werte der Interaktion von $hsCK2\beta^{1-193}$ mit in HEK293-EBNA-Zellen exprimierten katalytischen CK2-Untereinheiten

In HEK293-EBNA-Zellen wurden sowohl die Volllänge der $hsCK2\alpha_{HEK}$, als auch eine C-terminales Deletionsmutante ($hsCK2\alpha^{1-335}_{HEK}$) exprimiert. Ebenso wurde mit Hilfe dieses eukaryotischen Überexpressionssystems die paraloge $CK2\alpha^{C336S}$ exprimiert. Alle drei Proteine wurden mit Hilfe einer Affinitätschromatographie aus dem Zellkulturmedium in sauberer Form isoliert (s. Abb. 31, Kapitel 5.1.6, sowie Abb. 33). Die Proteine konnten allerdings nur in geringen Mengen gewonnen werden, so dass Messungen im FA-Assay nicht möglich waren.

Bisher wurde ITC zur Validierung der Messergebnisse des FA-Assays herangezogen. Allerdings werden auch hierfür relativ hohe Proteinmengen benötigt. Mit der MST war es jedoch möglich, einen Assay durchzuführen, da nur geringe Proteinmengen verwendet werden müssen. Auch kann bei der MST die Bindung mit der $hsCK2\beta^{1-193}$ direkt untersucht werden statt nur jene mit dem CK2 β -nachahmenden Peptid CF-Ahx-Pc. So wurden für alle drei Proteine mit Hilfe der MST K_D -Werte ermittelt. Die Graphen zu diesen Messungen sind in Abb. 55 in Kapitel 5.4.2 zu sehen, und die zugehörigen K_D -Werte sind in Tab. 36 im selben Kapitel aufgelistet. Der mit ITC-Experimenten ermittelte K_D -Wert für die Interaktion von $hsCK2\beta^{1-193}$ mit $hsCK2\alpha^{1-335}$ liegt bei 3,7 nM und für die paraloge $hsCK2\alpha^{C336S}$ bei 45,5 nM [87]. Die mit der MST ermittelten K_D -Werte für die in HEK293-EBNA-Zellen exprimierten Proteine liegen deutlich höher als die literaturbekannten Werte für in *E. coli* produzierte Proteine: für die beiden CK2 α -Varianten ca. um den Faktor 100 und für die Paraloge CK2 α' um den Faktor 21. Für die in HEK293-EBNA-Zellen exprimierte $hsCK2\alpha^{1-335}_{HEK}$ konnte zudem eine Messung mit dem FA-Assay durchgeführt werden (s. Abb. 66). Auch hier war zu erkennen, dass die $hsCK2\alpha^{1-335}_{HEK}$ eine deutlich geringere Affinität zu CF-Ahx-Pc zeigt als das in *E. coli* exprimierte Protein. Diese Experimente wurden jedoch nicht weiterverfolgt, da die gewonnenen Proteinmengen für sie nicht ausreichten.

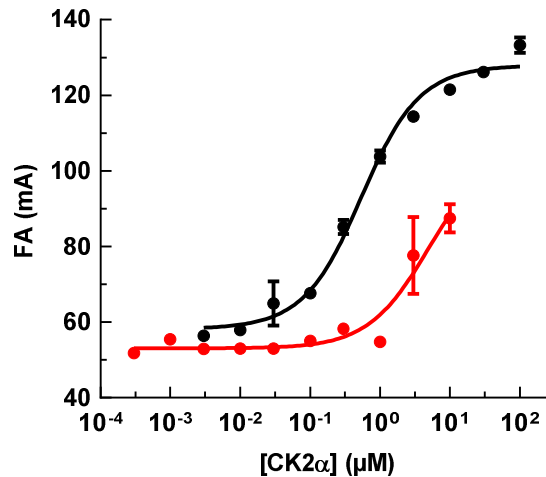


Abb. 66 K_D -Wert Bestimmung für die Interaktion von CF-Ahx-PC mit $CK2\alpha^{1-193}$ (*E. coli*) bzw. $CK2\alpha^{1-335}_{HEK}$ (HEK293-EBNA-Zellen):

FA-Messungen zur Ermittlung des K_D -Wertes der Interaktion von CF-Ahx-Pc mit $hsCK2\alpha^{1-193}$ aus *E. coli* (schwarz) sowie $hsCK2\alpha^{1-335}_{HEK}$ (rot) aus HEK293-EBNA-Zellen (rot). Aufgrund der geringen Proteinausbeuten und einer Verschiebung der K_D -Kurve konnte mit $hsCK2\alpha^{1-335}_{HEK}$ keine Sättigung erreicht werden. Die Graphen zeigen die Mittelwerte \pm SEM aus vier ($hsCK2\alpha^{1-193}$) bzw. zwei ($hsCK2\alpha^{1-335}_{HEK}$) Messungen im Triplikat.

Literaturrecherchen dahingehend, ob zu anderen CK2-Untereinheiten, die aus einem eukaryotischen Überexpressionssystem mit einer humanen Zelllinie isoliert wurden, führten zu keinem Ergebnis. In den meisten Fällen werden diese in *E. coli* exprimiert. Es gibt auch Systeme, welche Hefezellen, wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Candida albicans*, verwenden [91,211,212]. In den betreffenden Arbeiten wurde zum einen allein die CK2 α -Aktivität und zum anderen im Holoenzym bezüglich der Phosphorylierung ausgewählter Substrate betrachtet. Ebenso wurde die Inhibition dieser Reaktion untersucht. Es wurden jedoch keine Bindungsaffinitäten der CK2-Untereinheiten untereinander bestimmt. Auch gibt es eukaryotische Überexpressionssysteme, bei denen die Effekte der Überexpression betrachtet wurden bzw. die Aktivität der CK2. In diesen Arbeiten wurden die CK2-Untereinheiten jedoch nicht isoliert, um sie in einem biochemischen Assay zur Ermittlung von Bindungskonstanten zu verwenden. Es gibt somit keine direkten Vergleichswerte zu den in der vorliegenden Arbeit bestimmten K_D -Werten, die mit den aus HEK293-EBNA-Zellen exprimierten Proteinen ermittelt wurden.

Es gibt mehrere Hypothesen für den Anstieg des K_D -Wertes der CK2 α /CK2 β -Interaktion bei eukaryotischer Expression der CK2 α . Zum einen kann, wie bereits unter 5.1 beschrieben, die eukaryotische Expression zu posttranslationalen Veränderungen führen. Für die katalytische CK2-Untereinheit sind C-terminal Phosphorylierungs- sowie Glykolisierungsstellen bekannt. Die paraloge CK2 α^{C336S} hat hier vier Phosphorylierungsstellen sowie eine Glykolisierungsstelle weniger als die CK2 α (beide Proteine unterscheiden sich vor allem im

Bereich des C-Terminus) [88,89]. Möglicherweise führen solche posttranslationalen Modifikationen zu einer veränderten Affinität der CK2-Untereinheiten. Hierzu müsste zunächst geklärt werden, ob die vorliegenden Veränderungen der Molekülmasse, die in der SDS-Page beobachtet wurden, von solchen posttranslationalen Veränderungen herrühren oder ob es hierfür andere Gründe gibt.

Ein zweiter Erklärungsansatz wäre, dass die katalytischen CK2-Untereinheiten isoliert eine geringere Thermostabilität aufweisen als im CK2-Holoenzym. Hierzu wurden Studien mittels Differential-Scanning-Kalorimetrie durchgeführt, welche ergaben, dass bei 37 °C bereits die thermale Denaturierung der CK2 α einsetzt [52,132]. Die HEK293-EBNA-Zellen werden bei 37,5 °C kultiviert, wobei das Zellkulturmedium, in welches die Proteine sekretiert werden, für mindestens 24 h auf den Zellen verbleibt. Nimmt man nun die Beobachtungen aus dem FA-Assay, dass dort bereits nach 50 min eine Denaturierung der CK2 α einzusetzen scheint, hinzu, so ist davon auszugehen, dass dieser Effekt nach 24 h noch ausgeprägter ist. Wie bereits in Kapitel 6.1 erwähnt wurde, könnte dies ebenfalls ein Grund für die geringe Proteinausbeute sein und wäre nun zusätzlich ein Indikator für die geringere Affinität gegenüber der *hsCK2 β ¹⁻¹⁹³*. Durch die mögliche Denaturierung bzw. die thermisch bedingten Veränderungen in der Struktur der CK2 α -Untereinheiten würde es ebenfalls zu einer veränderten Interaktion mit der *hsCK2 β ¹⁻¹⁹³* kommen. Da bislang keine Kristallstruktur der in HEK293-EBNA-Zellen exprimierten katalytischen CK2-Untereinheiten vorliegt, kann auch hier keine abschließende Aussage getroffen werden. Die in diesem Kapitel aufgestellten Hypothesen können lediglich als Arbeitshypothesen dienen und bedürfen einer weiteren Überprüfung.

7 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse liefern eine Vielzahl weiterer Fragestellungen und somit Ausgangspunkte für weiterführende Arbeiten.

Der in dieser Arbeit optimierte FA-Assay liefert eine Grundlage zur Identifizierung neuer CK2 β -kompetitiver Substanzen. Mit den Derivaten des zyklischen Peptids Pc konnten bereits einige neue CK2 β -kompetitive Inhibitoren identifiziert werden, welche einer Weiterentwicklung bedürfen. Dabei sollte versucht werden, die Potenz der Peptidderivate weiter zu erhöhen. Die Zyklisierung der Pc-Derivate erfolgte bisher über die Oxidation zweier Cysteine (Disulfidbrücke), die gegenüber reduktiven Einflüssen nicht stabil sind. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Disulfidbrücke bei intrazellulären Untersuchungen reduktiv aufgelöst wird, ist sehr hoch. Daher müssten weitere Zyklisierungsmethoden erforscht werden, um die Stabilität der Peptide für intrazelluläre Testungen zu verbessern. Dies wurde bereits in der Masterarbeit von *Dirk Lindenblatt* in Angriff genommen, bedarf aber noch weiterer Optimierung.

Für die Nutzung des FA-Assay im HTS wird noch ein Substrat benötigt, welches mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich umgesetzt werden. Zur Umgehung der Autofluoreszenz von möglichen Inhibitoren, die in falsch positiven Ergebnissen resultieren könnten, wird ein solches Substrat benötigt. Ein weiteres Ziel war die Etablierung einer weiteren Messmethode neben der FA und der ITC, welche für die Identifizierung von CK2 β -kompetitiven Substanzen eingesetzt werden kann. Hierfür wurde die MST ausgewählt. Diese Methode lieferte Ergebnisse, die mit denen vergleichbar sind, welche in ITC-Messungen für die Affinität der CK2 α /CK2 β -Interaktion erhalten wurden. Auch hier sollten weitere Untersuchungen bezüglich der Dissoziation des CK2-Holoenzym angestellt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich versucht, die Assoziation des CK2-Holoenzym mit CK2 β -kompetitiven Substanzen zu verhindern. Dies bedeutet, dass für weitere Messungen zunächst das CK2-Holoenzym hergestellt wird und anschließend die Substanzen hinzugegeben werden.

Zudem sollten weitere Untersuchungen bezüglich der Substanzen vom Indeno[1,2-*b*]indol-Typ angestellt werden, welche für eine Herabsetzung des K_D -Wertes der CK2 α /CK2 β -Interaktion sorgen. Für genauere Aussagen wären Kristallstrukturen mit diesen Substanzen von Interesse. Diese könnten Aufschluss darüber geben, ob diese Substanzen neben der ATP-Bindungsstelle eine weitere Bindungsstelle einnehmen.

Mittels eines eukaryotischen Überexpressionsystems konnten die katalytischen Untereinheiten erfolgreich exprimiert werden. Die hier erhaltenen Proteine bedürfen aber einer weiteren Charakterisierung. Zum einen sollte mit Hilfe der Massenspektrometrie geklärt

werden, woher die Veränderungen der molekularen Massen der CK2 α -Proteine herrühren. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob es durch die Expression in Eukaryoten zu posttranslationalen Veränderungen gekommen ist. Weiterhin konnte bei der Expression der CK2 α eine gesteigerte Proliferation der transfizierten HEK293-EBNA-Zellen bzw. bei den mit CK2 β -transfizierten Zellen ein gehemmtes Wachstum beobachtet werden. Um diese Ergebnisse besser abzuklären, sollten ebenfalls weitere Versuche durchgeführt werden. Hierfür gibt es verschiedene Ansätze. Für die mit CK2 β -transfizierten Zellen sollten Untersuchungen zum einen hinsichtlich der Zellviabilität und zum anderen in Richtung des gehemmten Wachstums durchgeführt werden. Für die Zellen, welche mit katalytischen CK2-Untereinheiten transfiziert wurden, sollte die gesteigerte Proliferation im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen gemessen werden. Für beide Ansätze sollte die gesamte metabolische Aktivität gemessen werden. Hierzu kann mit Tetrazoliumsalzen, welche in metabolisch aktiven Zellen zu Formazan reduziert werden, gearbeitet werden. Dies ist eine spektrometrisch messbare Reaktion, die zum einen Auskunft über die Viabilität gibt und zum anderen auch im Zusammenhang mit der Proliferation der Zellen steht. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffes Resazurin. Für die Proliferation könnte auch mit einem BrdU-Assay gearbeitet werden. Hierbei handelt es sich um ein Thymidin-Analogon, welches bei der DNA-Synthese von den Zellen eingebaut wird. Eine hohe Inkorporation deutet dabei auf eine gesteigerte Proliferation hin.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Braun P., Gingras A.-C., "History of protein-protein interactions: from egg-white to complex networks" *Proteomics* **2012**; 12(10):1478–98.
- [2] Nooren I. M. A., Thornton J. M., "Structural characterisation and functional significance of transient protein–protein interactions" *Journal of Molecular Biology* **2003**; 325(5):991–1018.
- [3] Vidal M., Cusick M. E., Barabasi A.-L., "Interactome networks and human disease" *Cell* **2011**; 144(6):986–98.
- [4] Jones S., Thornton J. M., "Principles of protein-protein interactions" *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**; 93(1):13–20.
- [5] Ruffner H., Bauer A., Bouwmeester T., "Human protein-protein interaction networks and the value for drug discovery" *Drug Discov Today* **2007**; 12(17-18):709–16.
- [6] Berg T., "Modulation of protein-protein interactions with small organic molecules" *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**; 42(22):2462–81.
- [7] Hochscherf J., Lindenblatt D., Steinkruger M., Yoo E., Ulucan O., Herzig S., Issinger O.-G., Helms V., Gotz C., Neundorff I., Niefind K., Pietsch M., "Development of a high-throughput screening-compatible assay to identify inhibitors of the CK2 α /CK2 β interaction" *Anal Biochem* **2015**; 468:4–14.
- [8] Laudet B., Barette C., Dulery V., Renaudet O., Dumy P., Metz A., Prudent R., Deshiere A., Dideberg O., Filhol O., Cochet C., "Structure-based design of small peptide inhibitors of protein kinase CK2 subunit interaction" *Biochem J* **2007**; 408(3):363–73.
- [9] Ubersax J. A., Ferrell J. E. JR., "Mechanisms of specificity in protein phosphorylation" *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**; 8(7):530–41.
- [10] Yan J. X, Packer N. H., Gooley A. A., Williams K. L., "Protein phosphorylation: technologies for the identification of phosphoamino acids" *J Chromatogr A* **1998**; 808(1-2):23–41.
- [11] Klumpp S., Krieglstein J., "Reversible phosphorylation of histidine residues in vertebrate proteins" *Biochim Biophys Acta* **2005**; 1754(1-2):291–5.
- [12] Cohen P., "The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture" *Eur J Biochem* **2001**; 268(19):5001–10.
- [13] Manning G., Whyte D. B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S., "The protein kinase complement of the human genome" *Science* **2002**; 298(5600):1912–34.
- [14] Leonard C. J., Aravind L. & Koonin E. V., "Novel families of putative protein kinases in Bacteria and Archaea: Evolution of the "Eukaryotic" Protein Kinase Superfamily" *Genome Res.* **1998**(8):1038–47.
- [15] Pinna L. A, Ruzzene M., "How do protein kinases recognize their substrates?" *Biochim Biophys Acta* **1996**; 1314(3):191–225.

- [16] Hunter T., Plowman G. D., "The protein kinases of budding yeast: six score and more" *Trends Biochem Sci* **1997**; 22(1):18–22.
- [17] Braun A. P., Schulman H., "The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function" *Annu Rev Physiol* **1995**; 57:417–45.
- [18] Pavletich N. P., "Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of CDKs, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors" *Journal of Molecular Biology* **1999**; 287(5):821–8.
- [19] Taylor S. S., Ilouz R., Zhang P., Kornev A. P., "Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA" *Nat Rev Mol Cell Biol* **2012**; 13(10):646–58.
- [20] Raingeaud J., Gupta S., Rogers J. S., Dickens M., Han J., Ulevitch R. J., Davis R. J., "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine" *J Biol Chem* **1995**; 270(13):7420–6.
- [21] Cross D. A., Alessi D. R., Cohen P., Andjelkovich M., Hemmings B. A., "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B" *Nature* **1995**; 378(6559):785–9.
- [22] Cohen P., "Protein kinases-the major drug targets of the twenty-first century?" *Nat Rev Drug Discov* **2002**; 1(4):309–15.
- [23] Huse M., Kuriyan J., "The conformational plasticity of protein kinases" *Cell* **2002**; 109(3):275–82.
- [24] Hanks S. K., Hunter T., "Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification" *FASEB J* **1995**; 9(8):576–96.
- [25] Nagar B., Bornmann W. G., Pellicena P., Schindler T., Veach D. R., Miller W. T., Clarkson B., Kuriyan J., "Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571)" *Cancer Res* **2002**; 62(15):4236–43.
- [26] Podlipnik C., Tutino F., Bernardi A., Seneci P., "DFG-in and DFG-out homology models of TrkB kinase receptor: induced-fit and ensemble docking" *J Mol Graph Model* **2010**; 29(3):309–20.
- [27] Kornev A. P., Taylor S. S., ten Eyck L. F., "A generalized allosteric mechanism for cis-regulated cyclic nucleotide binding domains" *PLoS Comput Biol* **2008**; 4(4):e1000056.
- [28] Kornev A. P., Taylor S. S., ten Eyck L. F., "A helix scaffold for the assembly of active protein kinases" *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**; 105(38):14377–82.
- [29] Sawyer T. K., "Cancer metastasis therapeutic targets and drug discovery: emerging small-molecule protein kinase inhibitors" *Expert Opin Investig Drugs* **2004**; 13(1):1–19.
- [30] Traxler P., Furet P., "Strategies toward the design of novel and selective protein tyrosine kinase inhibitors" *Pharmacol Ther* **1999**; 82(2-3):195–206.

- [31] Liu Y., Gray N. S., "Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations" *Nat Chem Biol* **2006**; 2(7):358–64.
- [32] Eglen R. M., Reisine T., "The current status of drug discovery against the human kinome" *Assay Drug Dev Technol* **2009**; 7(1):22–43.
- [33] Knight Z. A., Shokat K. M., "Features of selective kinase inhibitors" *Chem Biol* **2005**; 12(6):621–37.
- [34] Noble, M. E., Endicott, J. A., Johnson L. N., "Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure" *Science* **2004**; 303(5665):1800–5.
- [35] Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J., "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings" *Adv Drug Deliv Rev* **2001**; 46(1-3):3–26.
- [36] Lipinski C. A., "Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution" *Drug Discov Today Technol* **2004**; 1(4):337–41.
- [37] Leeson P., "Drug discovery: Chemical beauty contest" *Nature* **2012**; 481(7382):455–6.
- [38] BURNETT G., KENNEDY E. P., "The enzymatic phosphorylation of proteins" *J Biol Chem* **1954**; 211(2):969–80.
- [39] Hathaway G. M., Traugh J. A., "Cyclic nucleotide-independent protein kinases from rabbit reticulocytes. Purification of casein kinases" *J. Biol. Chem.* **1979**; 254(3):762–8.
- [40] Guerra B., Issinger O.-G., "Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology" *Electrophoresis* **1999**; 20(2):391–408.
- [41] Faust M., Montenarh M., "Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function?" *Cell Tissue Res* **2000**; 301(3):329–40.
- [42] Meggio F., Pinna L. A., "One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?" *FASEB J* **2003**; 17(3):349–68.
- [43] Salvi M., Sarno S., Cesaro L., Nakamura H., Pinna L. A., "Extraordinary pleiotropy of protein kinase CK2 revealed by weblogo phosphoproteome analysis" *Biochim Biophys Acta* **2009**; 1793(5):847–59.
- [44] Guerra B., Issinger O.-G., "Protein kinase CK2 in human diseases" *Curr Med Chem* **2008**; 15(19):1870–86.
- [45] Litchfield D. W., "Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death" *Biochem J* **2003**; 369(Pt 1):1–15.
- [46] Blau J., "A new role for an old kinase: CK2 and the circadian clock" *Nat Neurosci* **2003**; 6(3):208–10.
- [47] Lou D. Y., Dominguez I., Toselli P., Landesman-Bollag E., O'Brien C., Seldin D. C., "The alpha catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development" *Mol Cell Biol* **2008**; 28(1):131–9.

- [48] Ahmed K., Gerber D. A., Cochet C., "Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2" *Trends Cell Biol* **2002**; 12(5):226–30.
- [49] Pinna LA (ed.), "Protein kinase CK2. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; **2013**.
- [50] Chantalat L., Leroy D., Filhol O., Nueda A., Benitez M. .J, Chambaz E. M., Cochet C., Dideberg O., "Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization" *EMBO J* **1999**; 18(11):2930–40.
- [51] Niefind K., Guerra B., Ermakowa I., Issinger O.-G., "Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme" *EMBO J* **2001**; 20(19):5320–31.
- [52] Raaf J., Brunstein E., Issinger O.-G., Niefind K., "The interaction of CK2 α and CK2 β , the subunits of protein kinase CK2, requires CK2 β in a preformed conformation and is enthalpically driven" *Protein Sci* **2008**; 17(12):2180–6.
- [53] Raaf J., Bischoff N., Klopffleisch K., Brunstein E., Olsen B. B., Vilks G., Litchfield D. W., Issinger O.-G., Niefind K., "Interaction between CK2 α and CK2 β , the subunits of protein kinase CK2: thermodynamic contributions of key residues on the CK2 α surface" *Biochemistry* **2011**; 50(4):512–22.
- [54] Allende J. E., Allende C. C., "Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation" *FASEB J* **1995**; 9(5):313–23.
- [55] Kannan N., Neuwald A. F., "Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2 α " *Protein Sci* **2004**; 13(8):2059–77.
- [56] Niefind K., Putter M., Guerra B., Issinger O.-G., Schomburg D., "GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2" *Nat Struct Biol* **1999**; 6(12):1100–3.
- [57] Traugh J. A., Traut R. R., "Characterization of protein kinases from rabbit reticulocytes" *J Biol Chem* **1974**; 249(4):1207–12.
- [58] Marchiori F., Meggio F., Marin O., Borin G., Calderan A., Ruzza P., Pinna L. A., "Synthetic peptide substrates for casein kinase 2. Assessment of minimum structural requirements for phosphorylation" *Biochim Biophys Acta* **1988**; 971(3):332–8.
- [59] Trembley J. H., Wang G., Unger G., Slaton J., Ahmed K., "Protein kinase CK2 in health and disease: CK2: a key player in cancer biology" *Cell Mol Life Sci* **2009**; 66(11-12):1858–67.
- [60] Seldin D. C., Leder P., "Casein kinase II alpha transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle" *Science* **1995**; 267(5199):894–7.
- [61] Ruzzene M., Penzo D., Pinna L. A., "Protein kinase CK2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) induces apoptosis and caspase-dependent degradation of haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) in Jurkat cells" *Biochem J* **2002**; 364(Pt 1):41–7.

- [62] Di Maira G., Brustolon F., Bertacchini J., Tosoni K., Marmiroli S., Pinna L. A., Ruzzene M., "Pharmacological inhibition of protein kinase CK2 reverts the multidrug resistance phenotype of a CEM cell line characterized by high CK2 level" *Oncogene* **2007**; 26(48):6915–26.
- [63] Homma M. K., Li D., Krebs E. G., Yuasa Y., Homma Y., "Association and regulation of casein kinase 2 activity by adenomatous polyposis coli protein" *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**; 99(9):5959–64.
- [64] Seitz G., Münstermann U., Schneider H. R., Issinger O.-G., "Characterization of casein kinase II in human colonic carcinomas after heterotransplantation into nude mice" *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1989**; 163(1):635–41.
- [65] Messmer U. K., Pereda-Fernandez C., Manderscheid M., Pfeilschifter J., "Dexamethasone inhibits TNF- α -induced apoptosis and IAP protein downregulation in MCF-7 cells" *Br J Pharmacol* **2001**; 133(4):467–76.
- [66] Münstermann U., Fritz G., Seitz G., Yiping L., Lu Y. P., Schneider H. R., Issinger O.-G., "Casein kinase II is elevated in solid human tumours and rapidly proliferating non-neoplastic tissue" *Eur J Biochem* **1990**; 189(2):251–7.
- [67] Yde C. W., Frogne T., Lykkesfeldt A. E., Fichtner I., Issinger O.-G., Stenvang J., "Induction of cell death in antiestrogen resistant human breast cancer cells by the protein kinase CK2 inhibitor DMAT" *Cancer Lett* **2007**; 256(2):229–37.
- [68] Guo C., Yu S., Davis A. T., Wang H., Green J. E., Ahmed K., "A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells" *J Biol Chem* **2001**; 276(8):5992–9.
- [69] Slaton J. W., Unger G. M., Sloper D. T., Davis A. T., Ahmed K., "Induction of apoptosis by antisense CK2 in human prostate cancer xenograft model" *Mol Cancer Res* **2004**; 2(12):712–21.
- [70] Wang G., Unger G., Ahmad K. A., Slaton J. W., Ahmed K., "Downregulation of CK2 induces apoptosis in cancer cells – a potential approach to cancer therapy" *Mol Cell Biochem* **2005**; 274(1-2):77–84.
- [71] Wang G., Ahmad K. A., Ahmed K., "Role of protein kinase CK2 in the regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-induced apoptosis in prostate cancer cells" *Cancer Res* **2006**; 66(4):2242–9.
- [72] Cozza G., Bortolato A., Moro S., "How druggable is protein kinase CK2?" *Med Res Rev* **2010**; 30(3):419–62.
- [73] Lolli G., Ranchio A., Battistutta R., "Active form of the protein kinase CK2 $\alpha_2\beta_2$ holoenzyme is a strong complex with symmetric architecture" *ACS Chem Biol* **2014**; 9(2):366–71.
- [74] Gietz R. D., Graham K. C., Litchfield D. W., "Interactions between the subunits of casein kinase II" *J Biol Chem* **1995**; 270(22):13017–21.

- [75] Niefind K., Issinger O.-G., "Conformational plasticity of the catalytic subunit of protein kinase CK2 and its consequences for regulation and drug design" *Biochim Biophys Acta* **2010**; 1804(3):484–92.
- [76] Niefind K., Guerra B., Pinna L. A., Issinger O. G, Schomburg D., "Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays* at 2.1 Å resolution" *EMBO J* **1998**; 17(9):2451–62.
- [77] Donella-Deana A., Cesaro L., Sarno S., Brunati A. M., Ruzzene M., Pinna L. A., "Autocatalytic tyrosine-phosphorylation of protein kinase CK2 α and α' subunits: implication of Tyr182" *Biochem J* **2001**; 357(Pt 2):563–7.
- [78] Niefind K., Issinger O.-G., "Primary and secondary interactions between CK2 α and CK2 β lead to ring-like structures in the crystals of the CK2 holoenzyme" *Mol Cell Biochem* **2005**; 274(1-2):3–14.
- [79] Pagano M. A., Sarno S., Poletto G., Cozza G., Pinna L. A., Meggio F., "Autophosphorylation at the regulatory beta subunit reflects the supramolecular organization of protein kinase CK2" *Mol Cell Biochem* **2005**; 274(1-2):23–9.
- [80] Glover C. V., "A filamentous form of *Drosophila* casein kinase II" *J Biol Chem* **1986**; 261(30):14349–54.
- [81] Valero E., Bonis S. DE, Filhol O., Wade R. H., Langowski J., Chambaz E. M., Cochet C., "Quaternary structure of casein kinase 2. Characterization of multiple oligomeric states and relation with its catalytic activity" *J Biol Chem* **1995**; 270(14):8345–52.
- [82] Seetoh W.-G., Chan D. S.-H., Matak-Vinkovic D., Abell C., "Mass Spectrometry Reveals Protein Kinase CK2 High-Order Oligomerization via the Circular and Linear Assembly" *ACS Chem Biol* **2016**; 11(6):1511–7.
- [83] Lozeman F. J., Litchfield D. W., Piening C., Takio K., Walsh K. A., Krebs E. G., "Isolation and characterization of human cDNA clones encoding the alpha and the alpha' subunits of casein kinase II" *Biochemistry* **1990**; 29(36):8436–47.
- [84] Yang-Feng T. L., Naiman T., Kopatz I., Eli D., Dafni N., Canaani D., "Assignment of the human casein kinase II α' subunit gene (CSNK2A1) to chromosome 16p13.2-p13.3" *Genomics* **1994**; 19(1):173.
- [85] Klug W. S., Cummings M. R., Spencer C. A., "Genetik. 8th ed. München: Pearson Studium; **2007**.
- [86] Niefind K., Raaf J., Issinger O.-G., "Protein kinase CK2 in health and disease: Protein kinase CK2: from structures to insights" *Cell Mol Life Sci* **2009**; 66(11-12):1800–16.
- [87] Bischoff N., Olsen B., Raaf J., Bretner M., Issinger O.-G., Niefind K., "Structure of the human protein kinase CK2 catalytic subunit CK2 α' and interaction thermodynamics with the regulatory subunit CK2 β " *Journal of Molecular Biology* **2011**; 407(1):1–12.

- [88] Messenger M. M., Saulnier R. B., Gilchrist A. D., Diamond P., Gorbsky G. J., Litchfield D. W., "Interactions between protein kinase CK2 and Pin1. Evidence for phosphorylation-dependent interactions" *J Biol Chem* **2002**; 277(25):23054–64.
- [89] Bosc D. G., Graham K. C., Saulnier R. B., Zhang C., Prober D., Gietz R. D., Litchfield D. W., "Identification and characterization of CKIP-1, a novel pleckstrin homology domain-containing protein that interacts with protein kinase CK2" *J Biol Chem* **2000**; 275(19):14295–306.
- [90] Guerra B., Siemer S., Boldyreff B., Issinger O. G., "Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2 β subunit fraction, devoid of the catalytic CK2 α subunit, in mouse brain and testicles" *FEBS Lett* **1999**; 462(3):353–7.
- [91] Padmanabha R., Chen-Wu J. L., Hanna D. E., Glover C. V., "Isolation, sequencing, and disruption of the yeast CKA2 gene: casein kinase II is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*" *Mol Cell Biol* **1990**; 10(8):4089–99.
- [92] Xu X., Toselli P. A., Russell L. D., Seldin D. C., "Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II α' catalytic subunit" *Nat Genet* **1999**; 23(1):118–21.
- [93] Olsen B. B., Boldyreff B., Niefind K., Issinger O.-G., "Purification and characterization of the CK2 α' -based holoenzyme, an isozyme of CK2 α : a comparative analysis" *Protein Expr Purif* **2006**; 47(2):651–61.
- [94] Janeczko M., Maslyk M., Szyszka R., Baier A., "Interactions between subunits of protein kinase CK2 and their protein substrates influences its sensitivity to specific inhibitors" *Mol Cell Biochem* **2011**; 356(1-2):121–6.
- [95] Livak K. J., "Detailed structure of the *Drosophila melanogaster* stellate genes and their transcripts" *Genetics* **1990**; 124(2):303–16.
- [96] Issinger O.-G., "Casein kinases: pleiotropic mediators of cellular regulation" *Pharmacol Ther* **1993**; 59(1):1–30.
- [97] Boldyreff B., Meggio F., Pinna L. A., Issinger O.-G., "Protein kinase CK2 structure-function relationship: effects of the β subunit on reconstitution and activity" *Cell Mol Biol Res* **1994**; 40(5-6):391–9.
- [98] Bibby A. C., Litchfield D. W., "The multiple personalities of the regulatory subunit of protein kinase CK2: CK2 dependent and CK2 independent roles reveal a secret identity for CK2 β " *Int J Biol Sci* **2005**; 1(2):67–79.
- [99] Bidwai A. P., Reed J. C., Glover C. V., "Phosphorylation of calmodulin by the catalytic subunit of casein kinase II is inhibited by the regulatory subunit" *Arch Biochem Biophys* **1993**; 300(1):265–70.
- [100] Lieberman S. L., Ruderman J. V., "CK2 β which inhibits Mos function, binds to a discrete domain in the N-terminus of Mos" *Dev Biol* **2004**; 268(2):271–9.

- [101] Boldyreff B., Issinger O.-G., "A-Raf kinase is a new interacting partner of protein kinase CK2 β subunit" *FEBS Lett* **1997**; 403(2):197–9.
- [102] Guerra B., Issinger O.-G., Wang J. Y., "Modulation of human checkpoint kinase Chk1 by the regulatory beta-subunit of protein kinase CK2" *Oncogene* **2003**; 22(32):4933–42.
- [103] Buchou T., Vernet M., Blond O., Jensen H. H., Pointu H., Olsen B. B., Cochet C., Issinger O.-G., Boldyreff B., "Disruption of the regulatory β subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality" *Mol Cell Biol* **2003**; 23(3):908–15.
- [104] Boldyreff B., Meggio F., Pinna L. A., Issinger O.-G., "Reconstitution of normal and hyperactivated forms of casein kinase-2 by variably mutated β -subunits" *Biochemistry* **1993**; 32(47):12672–7.
- [105] Meggio F., Boldyreff B., Marin O., Pinna L. A., Issinger O.-G., "Role of the β subunit of casein kinase-2 on the stability and specificity of the recombinant reconstituted holoenzyme" *Eur J Biochem* **1992**; 204(1):293–7.
- [106] Boldyreff B., Mietens U., Issinger O.-G., "Structure of protein kinase CK2: dimerization of the human β -subunit" *FEBS Lett* **1996**; 379(2):153–6.
- [107] Prudent R., Cochet C., "New protein kinase CK2 inhibitors: jumping out of the catalytic box" *Chem Biol* **2009**; 16(2):112–20.
- [108] Zandomeni R., Weinmann R., "Inhibitory effect of 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole on a protein kinase" *J Biol Chem* **1984**; 259(23):14804–11.
- [109] Zien P., Bretner M., Zastapilo K., Szyszka R., Shugar D., "Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole as an ATP-competitive potent inhibitor of protein kinase CK2 from various sources" *Biochem Biophys Res Commun* **2003**; 306(1):129–33.
- [110] Gianoncelli A., Cozza G., Orzeszko A., Meggio F., Kazimierczuk Z., Pinna L. A., "Tetraiodobenzimidazoles are potent inhibitors of protein kinase CK2" *Bioorg Med Chem* **2009**; 17(20):7281–9.
- [111] Sarno S., Moro S., Meggio F., Zagotto G., Dal Ben D., Ghisellini P., Battistutta R., Zanotti G., Pinna L. A., "Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors" *Pharmacol Ther* **2002**; 93(2-3):159–68.
- [112] Yim H., Lee Y. H., Lee C. H., Lee S. K., "Emodin, an anthraquinone derivative isolated from the rhizomes of *Rheum palmatum*, selectively inhibits the activity of casein kinase II as a competitive inhibitor" *Planta Med* **1999**; 65(1):9–13.
- [113] Hung M. S., Xu Z., Lin Y. C., Mao J. H., Yang C. T., Chang P. J., Jablons D. M., You L., "Identification of hematein as a novel inhibitor of protein kinase CK2 from a natural product library" *BMC Cancer* **2009**; 9:135.
- [114] Cozza G., Bonvini P., Zorzi E., Poletto G., Pagano M. A., Sarno S., Donella-Deana A., Zagotto G., Rosolen A., Pinna L. A., Meggio F., Moro S., "Identification of ellagic acid as

- potent inhibitor of protein kinase CK2: a successful example of a virtual screening application" *J Med Chem* **2006**; 49(8):2363–6.
- [115] Golub A. G., Bdzhola V. G., Kyshenia Y. V., Sapelkin V. M., Prykhod'ko A. O., Kukharenko O. P., Ostrynska O. V., Yarmoluk S. M., "Structure-based discovery of novel flavonol inhibitors of human protein kinase CK2" *Mol Cell Biochem* **2011**; 356(1-2):107–15.
- [116] Meggio F., Pagano M. A, Moro S., Zagotto G., Ruzzene M., Sarno S., Cozza G., Bain J., Elliott M., Deana A. D., Brunati A. M, Pinna L. A., "Inhibition of protein kinase CK2 by condensed polyphenolic derivatives. An in vitro and in vivo study" *Biochemistry* **2004**; 43(40):12931–6.
- [117] Pierre F., Chua P. C., O'Brien S. E., Siddiqui-Jain A., Bourbon P., Haddach M., Michaux J., Nagasawa J., Schwaebe M. K., Stefan E., Viallettes A., Whitten J. P., Chen T. K., Darjania L., Stansfield R., Anderes K., Bliesath J., Drygin D., Ho C., Omori M., Proffitt C., Streiner N., Trent K., Rice W. G., Ryckman D. M., "Discovery and SAR of 5-(3-chlorophenylamino)benzoc2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid (CX-4945), the first clinical stage inhibitor of protein kinase CK2 for the treatment of cancer" *J Med Chem* **2011**; 54(2):635–54.
- [118] Pierre F., Chua P. C., O'Brien S. E., Siddiqui-Jain A., Bourbon P., Haddach M., Michaux J., Nagasawa J., Schwaebe M. K., Stefan E., Viallettes A., Whitten J. P., Chen T. K., Darjania L., Stansfield R., Bliesath J., Drygin D., Ho C., Omori M., Proffitt C., Streiner N., Rice W. G., Ryckman D. M., Anderes K., "Pre-clinical characterization of CX-4945, a potent and selective small molecule inhibitor of CK2 for the treatment of cancer" *Mol Cell Biochem* **2011**; 356(1-2):37–43.
- [119] Hathaway G. M., Traugh J. A., "Casein kinases-multipotential protein kinases" *Curr Top Cell Regul* **1982**; 21:101–27.
- [120] Lee W.-K., Son S. H., Jin B.-S., Na J.-H., Kim S.-Y., Kim K.-H., Kim E. E., Yu Y. G., Lee H. H., "Structural and functional insights into the regulation mechanism of CK2 by IP6 and the intrinsically disordered protein Nopp140" *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**; 110(48):19360–5.
- [121] Hathaway G. M., Lubben T. H., Traugh J. A., "Inhibition of casein kinase II by heparin" *J Biol Chem* **1980**; 255(17):8038–41.
- [122] O'Farrell F., Loog M., Janson I. M., Ek P., "Kinetic study of the inhibition of CK2 by heparin fragments of different length" *Biochim Biophys Acta* **1999**; 1433(1-2):68–75.
- [123] Perea S. E, Reyes O., Puchades Y., Mendoza O., Vispo N. S., Torrens I., Santos A., Silva R., Acevedo B., Lopez E., Falcon V., Alonso D. F, "Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide that impairs the phosphorylation by the protein kinase 2 (casein kinase 2)" *Cancer Res* **2004**; 64(19):7127–9.

- [124] Perea S. E, Reyes O., Baladron I., Perera Y., Farina H., Gil J., Rodriguez A., Bacardi D., Marcelo J. L, Cosme K., Cruz M., Valenzuela C., Lopez-Saura P. A, Puchades Y., Serrano J. M, Mendoza O., Castellanos L., Sanchez A., Betancourt L., Besada V., Silva R., Lopez E., Falcon V., Hernandez I., Solares M., Santana A., Diaz A., Ramos T., Lopez C., Ariosa J., Gonzalez L. J, Garay H., Gomez D., Gomez R., Alonso D. F, Sigman H., Herrera L., Acevedo B., "CIGB-300, a novel proapoptotic peptide that impairs the CK2 phosphorylation and exhibits anticancer properties both in vitro and in vivo" *Mol Cell Biochem* **2008**; 316(1-2):163–7.
- [125] Perea S. E, Baladron I., Garcia Y., Perera Y., Lopez A., Soriano J. L, Batista N., Palau A., Hernandez I., Farina H., Garcia I., Gonzalez L., Gil J., Rodriguez A., Solares M., Santana A., Cruz M., Lopez M., Valenzuela C., Reyes O., Lopez-Saura P. A., Gonzalez C. A, Diaz A., Castellanos L., Sanchez A., Betancourt L., Besada V., Gonzalez L. J, Garay H., Gomez R., Gomez D. E, Alonso D. F, Perrin P., Renualt J.-Y., Sigman H., Herrera L., Acevedo B., "CIGB-300, a synthetic peptide-based drug that targets the CK2 phosphoacceptor domain. Translational and clinical research" *Mol Cell Biochem* **2011**; 356(1-2):45–50.
- [126] Perera Y., Toro N. D., Gorovaya L., Fernandez-DE-Cossio J., Farina H. G., Perea S. E., "Synergistic interactions of the anti-casein kinase 2 CIGB-300 peptide and chemotherapeutic agents in lung and cervical preclinical cancer models" *Mol Clin Oncol* **2014**; 2(6):935–44.
- [127] Perera Y., Farina H. G., Gil J., Rodriguez A., Benavent F., Castellanos L., Gómez R. E., Acevedo B. E., Alonso D. F, Perea S. E., "Anticancer peptide CIGB-300 binds to nucleophosmin/B23, impairs its CK2-mediated phosphorylation, and leads to apoptosis through its nucleolar disassembly activity" *Mol Cancer Ther* **2009**; 8(5):1189–96.
- [128] Prudent R., Moucadel V., Laudet B., Barette C., Lafanechere L., Hasenknopf B., Li J., Bareyt S., Lacote E., Thorimbert S., Malacria M., Gouzerh P., Cochet C., "Identification of polyoxometalates as nanomolar noncompetitive inhibitors of protein kinase CK2" *Chem Biol* **2008**; 15(7):683–92.
- [129] Martel V., Filhol O., Colas P., Cochet C., "p53-dependent inhibition of mammalian cell survival by a genetically selected peptide aptamer that targets the regulatory subunit of protein kinase CK2" *Oncogene* **2006**; 25(56):7343–53.
- [130] Filhol O., Nueda A., Martel V., Gerber-Scokaert D., Benitez M. J., Souchier C., Saoudi Y., Cochet C., "Live-cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual subunits" *Mol Cell Biol* **2003**; 23(3):975–87.
- [131] Raaf J., Guerra B., Neundorff I., Bopp B., Issinger O.-G., Jose J., Pietsch M., Niefind K., "First structure of protein kinase CK2 catalytic subunit with an effective CK2 β -competitive ligand" *ACS Chem Biol* **2013**; 8(5):901–7.

- [132] Raaf J., Brunstein E., Issinger O.-G., Niefind K., "The CK2 α /CK2 β interface of human protein kinase CK2 harbors a binding pocket for small molecules" *Chem Biol* **2008**; 15(2):111–7.
- [133] Laudet B., Moucadel V., Prudent R., Filhol O., Wong Y.-S., Royer D., Cochet C., "Identification of chemical inhibitors of protein-kinase CK2 subunit interaction" *Mol Cell Biochem* **2008**; 316(1-2):63–9.
- [134] Alchab F., Ettouati L., Bouaziz Z., Bollacke A., Delcros J.-G., Gertzen C. G., Gohlke H., Pinaud N., Marchivie M., Guillon J., Fenet B., Jose J., Le Borgne M., "Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling of Substituted Indeno1,2-bindoles as Inhibitors of Human Protein Kinase CK2" *Pharmaceuticals (Basel)* **2015**; 8(2):279–302.
- [135] Hundsdorfer C., Hemmerling H.-J., Gotz C., Totzke F., Bednarski P., Le Borgne M., Jose J., "Indeno[1,2-b]indole derivatives as a novel class of potent human protein kinase CK2 inhibitors" *Bioorg Med Chem* **2012**; 20(7):2282–9.
- [136] Hundsdörfer C., Hemmerling H.-J., Hamberger J., Le Borgne M., Bednarski P., Gotz C., Totzke F., Jose J., "Novel indeno1,2-bindoloquinones as inhibitors of the human protein kinase CK2 with antiproliferative activity towards a broad panel of cancer cell lines" *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2012**; 424(1):71–5.
- [137] Zhou M., Li Q., Wang R., "Current Experimental Methods for Characterizing Protein-Protein Interactions" *ChemMedChem* **2016**; 11(8):738–56.
- [138] Jameson D. M., "Gregorio Weber, 1916–1997: A Fluorescent Lifetime" *Biophysical Journal* **1998**; 75(1):419–21.
- [139] McGlynn S. P., "Fluorescence and Phosphorescence Analysis. Principles and Applications" *J. Am. Chem. Soc.* **1966**; 88(23):5688.
- [140] WEBER G., "Polarization of the fluorescence of macromolecules. I. Theory and experimental method" *Biochem J* **1952**; 51(2):145–55.
- [141] WEBER G., "Rotational Brownian motion and polarization of the fluorescence of solutions" *Adv Protein Chem* **1953**; 8:415–59.
- [142] Jameson D. M., Seifried S. E., "Quantification of protein-protein interactions using fluorescence polarization" *Methods* **1999**; 19(2):222–33.
- [143] Jameson D. M., Ross J. A., "Fluorescence polarization/anisotropy in diagnostics and imaging" *Chem Rev* **2010**; 110(5):2685–708.
- [144] Jabłoński A., "On the Notion of Emission Anisotropy" *Academie Polonaise des Sciences et des Letters* **1960**; 8(4).
- [145] Perrin F., *J. Phys. Radium* **1926**; 7:390–401.
- [146] Jameson D. M., Croney J. C., Moens P. D. J., "Fluorescence: basic concepts, practical aspects, and some anecdotes" *Methods Enzymol* **2003**; 360:1–43.
- [147] Soleillet P. *Ann Phys* **1929**; 12(23).

- [148] Bachovchin D. A., Cravatt B. F., "The pharmacological landscape and therapeutic potential of serine hydrolases" *Nat Rev Drug Discov* **2012**; 11(1):52–68.
- [149] Ludwig C., "Diffusion zwischen ungleich erwärmten Orten gleich zusammengesetzter Lösungen." *Sitzungsber Akad Wiss Wien Math-Naturwiss* **1856**; 20:539.
- [150] Soret C. *Arch Geneve* **1879**; 3(48-64).
- [151] Schimpf M. E., Semenov S. N., "Mechanism of Polymer Thermophoresis in Nonaqueous Solvents" *J. Phys. Chem. B* **2000**; 104(42):9935–42.
- [152] Groot S. R. D., Mazur P., "Non-Equilibrium Thermodynamics. Newburyport: Dover Publications; **2013**.
- [153] Epstein P. S., *Z Phys* **1929**; 54:537.
- [154] Maxwell J. C., Niven W. D. (eds.), "The scientific papers of James Clerk Maxwell. 1890th ed. Cambridge: Univ. Press; **2011**.
- [155] Duhr S., Braun D., "Why molecules move along a temperature gradient" *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**; 103(52):19678–82.
- [156] Jerabek-Willemsen M., Wienken C. J., Braun D., Baaske P., Duhr S., "Molecular interaction studies using Microscale Thermophoresis" *Assay Drug Dev Technol* **2011**; 9(4):342–53.
- [157] Seidel S. A., Dijkman P. M., Lea W. A., van den Bogaart G., Jerabek-Willemsen M., Lazic A., Joseph J. S., Srinivasan P., Baaske P., Simeonov A., Katritch I., Melo F. A., Ladbury J. E., Schreiber G., Watts A., Braun D., Duhr S., "Microscale Thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions" *Methods* **2013**; 59(3):301–15.
- [158] Duhr S., Braun D., "Thermophoretic depletion follows Boltzmann distribution" *Phys Rev Lett* **2006**; 96(16):168301.
- [159] Kawahashi Y., Doi N., Takashima H., Tsuda C., Oishi Y., Oyama R., Yonezawa M., Miyamoto-Sato E., Yanagawa H., "In vitro protein microarrays for detecting protein-protein interactions: application of a new method for fluorescence labeling of proteins" *Proteomics* **2003**; 3(7):1236–43.
- [160] Hohsaka T., Abe R., Shiraga K., Sisido M., "Incorporation of fluorescently labeled nonnatural amino acids into proteins in an *E. coli* in vitro translation system" *Nucleic Acids Res Suppl* **2003**(3):271–2.
- [161] Serwa R., Wilkening I., Del Signore G., Muhlberg M., Claussnitzer I., Weise C., Gerrits M., Hackenberger C. P., "Chemoselective Staudinger-phosphite reaction of azides for the phosphorylation of proteins" *Angew Chem Int Ed Engl* **2009**; 48(44):8234–9.
- [162] Studier F. W., Moffatt B. A., "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes" *Journal of Molecular Biology* **1986**; 189(1):113–30.

- [163] Hanahan D., "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids" *Journal of Molecular Biology* **1983**; 166(4):557–80.
- [164] Kostylev M., Otwell A. E., Richardson R. E., Suzuki Y., "Cloning Should Be Simple: *Escherichia coli* DH5alpha-Mediated Assembly of Multiple DNA Fragments with Short End Homologies" *PLoS One* **2015**; 10(9):e0137466.
- [165] Schochetman G., Ou C.-Y., Jones W. K., "Polymerase Chain Reaction" *Journal of Infectious Diseases* **1988**; 158(6):1154–7.
- [166] Voet D. J., Voet J. G., Pratt C. W., Beck-Sickinger AG, Hahn U, Häcker B (eds.), "Lehrbuch der Biochemie. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH-Verl; **2010**.
- [167] Aaij C., Borst P., "The gel electrophoresis of DNA" *Biochim Biophys Acta* **1972**; 269(2):192–200.
- [168] Gutjahr A., Xu S.-Y., "Engineering nicking enzymes that preferentially nick 5-methylcytosine-modified DNA" *Nucleic Acids Res* **2014**; 42(9):e77.
- [169] Gibson D. G., Young L., Chuang R.-Y., Venter J. C., Hutchison C. A., Smith H. O., "Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases" *Nat Methods* **2009**; 6(5):343–5.
- [170] Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R., "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors" *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**; 74(12):5463–7.
- [171] Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M. R., Appel R. D., Bairoch A., "Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: *Walker JM*, editor, "The Proteomics Protocols Handbook. Totowa, NJ: Humana Press Inc; **2005**, p. 571–607.
- [172] Kaiser E., Colescott R. L., Bossinger C. D., Cook P. I., "Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides" *Anal Biochem* **1970**; 34(2):595–8.
- [173] Nikolovska-Coleska Z., Wang R., Fang X., Pan H., Tomita Y., Li P., Roller P. P., Krajewski K., Saito N. G., Stuckey J. A., Wang S., "Development and optimization of a binding assay for the XIAP BIR3 domain using fluorescence polarization" *Anal Biochem* **2004**; 332(2):261–73.
- [174] Ermakova I., Boldyreff B., Issinger O.-G., Niefind K., "Crystal structure of a C-terminal deletion mutant of human protein kinase CK2 catalytic subunit" *Journal of Molecular Biology* **2003**; 330(5):925–34.
- [175] van Craenenbroeck K., Vanhoenacker P., Duchau H., Haegeman G., "Molecular integrity and usefulness of episomal expression vectors derived from BK and Epstein-Barr virus" *Gene* **2000**; 253(2):293–301.
- [176] van Craenenbroeck K., Vanhoenacker P., Haegeman G., "Episomal vectors for gene expression in mammalian cells" *Eur J Biochem* **2000**; 267(18):5665–78.

- [177] Voss S., Skerra A., "Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification" *Protein Eng* **1997**; 10(8):975–82.
- [178] Siddiqui-Jain A., Drygin D., Streiner N., Chua P., Pierre F., O'Brien S. E., Bliesath J., Omori M., Huser N., Ho C., Proffitt C., Schwaebe M. K., Ryckman D. M., Rice W. G., Anderes K., "CX-4945, an orally bioavailable selective inhibitor of protein kinase CK2, inhibits prosurvival and angiogenic signaling and exhibits antitumor efficacy" *Cancer Res* **2010**; 70(24):10288–98.
- [179] Grankowski N., Boldyreff B., Issinger O.-G., "Isolation and characterization of recombinant human casein kinase II subunits α and β from bacteria" *Eur J Biochem* **1991**; 198(1):25–30.
- [180] Zhang J.-H., Chung T. D., Oldenburg K. D., "A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays" *J Biomol Screen* **1999**; 4(2):67–73.
- [181] Niefind K., Guerra B., Ermakowa I., Issinger O.-G., "Crystallization and preliminary characterization of crystals of human protein kinase CK2" *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2000**; 56(12):1680–4.
- [182] Padmanabha R., Glover C. V., "Casein kinase II of yeast contains two distinct alpha polypeptides and an unusually large β subunit" *J Biol Chem* **1987**; 262(4):1829–35.
- [183] Reed J. C., Bidwai A. P., Glover C. V., "Cloning and disruption of CKB2, the gene encoding the 32-kDa regulatory β' -subunit of *Saccharomyces cerevisiae* casein kinase II" *J Biol Chem* **1994**; 269(27):18192–200.
- [184] Lebrin F., Chambaz E. M., Bianchini L., "A role for protein kinase CK2 in cell proliferation: evidence using a kinase-inactive mutant of CK2 catalytic subunit α " *Oncogene* **2001**; 20(16):2010–22.
- [185] Di Maira G., Brustolon F., Tosoni K., Belli S., Kramer S. D., Pinna L. A., Ruzzene M., "Comparative analysis of CK2 expression and function in tumor cell lines displaying sensitivity vs. resistance to chemical induced apoptosis" *Mol Cell Biochem* **2008**; 316(1-2):155–61.
- [186] Vilks G., Saulnier R. B., St Pierre R., Litchfield D. W., "Inducible expression of protein kinase CK2 in mammalian cells. Evidence for functional specialization of CK2 isoforms" *J Biol Chem* **1999**; 274(20):14406–14.
- [187] Sheikh M., "Identification and Kinetic Characterization of Novel Inhibitors of Cholesterol Esterase as Anti-Atherosclerotic Agents and Novel Insights into the Bile Salt-induced Activation Mechanism [Dissertation]. Köln: Medizinische Fakultät der Universität zu Köln; **2016**.

- [188] Klumpp S., Zhang Z., Hwa T., "Growth rate-dependent global effects on gene expression in bacteria" *Cell* **2009**; 139(7):1366–75.
- [189] Klumpp S., Hwa T., "Bacterial growth: global effects on gene expression, growth feedback and proteome partition" *Curr Opin Biotechnol* **2014**; 28:96–102.
- [190] Croset A., Delafosse L., Gaudry J.-P., Arod C., Glez L., Losberger C., Begue D., Krstanovic A., Robert F., Vilbois F., Chevalet L., Antonsson B., "Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells" *J Biotechnol* **2012**; 161(3):336–48.
- [191] Roussou I., Draetta G., "The *Schizosaccharomyces pombe* casein kinase II α and β subunits: Evolutionary conservation and positive role of the beta subunit" *Mol. Cell. Biol.* **1994**; 14(1):576–86.
- [192] Li D., Dobrowolska G., Aicher L. D., Chen M., Wright J. H., Drueckes P., Dunphy E. L., Munar E. S., Krebs E. G., "Expression of the Casein Kinase 2 Subunits in Chinese Hamster Ovary and 3T3 L1 Cells Provides Information on the Role of the Enzyme in Cell Proliferation and the Cell Cycle" *Journal of Biological Chemistry* **1999**; 274(46):32988–96.
- [193] Teitz T., Eli D., Penner M., Bakhanashvili M., Naiman T., Timme T. L., Wood C. M., Moses R. E., Canaani D., "Expression of the cDNA for the beta subunit of human casein kinase II confers partial UV resistance on xeroderma pigmentosum cells" *Mutat Res* **1990**; 236(1):85–97.
- [194] Toczyski D. P., Galgoczy D. J., Hartwell L. H., "CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint" *Cell* **1997**; 90(6):1097–106.
- [195] Stingele S., Stoehr G., Storchova Z., "Activation of autophagy in cells with abnormal karyotype" *Autophagy* **2013**; 9(2):246–8.
- [196] Sivachandran N., Cao J. Y., Frappier L., "Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 Hijacks the host kinase CK2 to disrupt PML nuclear bodies" *J Virol* **2010**; 84(21):11113–23.
- [197] Sivachandran N., Dawson C. W., Young L. S., Liu F.-F., Middeldorp J., Frappier L., "Contributions of the Epstein-Barr virus EBNA1 protein to gastric carcinoma" *J Virol* **2012**; 86(1):60–8.
- [198] Hauser C., Wodtke R., Löser R., Pietsch M., "A fluorescence anisotropy-based assay for determining the activity of tissue transglutaminase" *Amino Acids* **2016**.
- [199] Sarno S., Ghisellini P., Pinna L. A., "Unique activation mechanism of protein kinase CK2. The N-terminal segment is essential for constitutive activity of the catalytic subunit but not of the holoenzyme" *J Biol Chem* **2002**; 277(25):22509–14.
- [200] Wienken C. J., Baaske P., Rothbauer U., Braun D., Duhr S., "Protein-binding assays in biological liquids using Microscale Thermophoresis" *Nat Commun* **2010**; 1:100.
- [201] Braun D., Libchaber A., "Trapping of DNA by thermophoretic depletion and convection" *Phys Rev Lett* **2002**; 89(18):188103.

- [202] Olsen B. B., Rasmussen T., Niefind K., Issinger O.-G., "Biochemical characterization of CK2 α and α' paralogues and their derived holoenzymes: evidence for the existence of a heterotrimeric CK2 α '-holoenzyme forming trimeric complexes" *Mol Cell Biochem* **2008**; 316(1-2):37–47.
- [203] Onuoha S. C., Mukund S. R., Coulstock E. T., Sengerova B., Shaw J., McLaughlin S. H., Jackson S. E., "Mechanistic studies on Hsp90 inhibition by ansamycin derivatives" *Journal of Molecular Biology* **2007**; 372(2):287–97.
- [204] Tjernberg A., Markova N., Griffiths W. J., Hallen D., "DMSO-related effects in protein characterization" *J Biomol Screen* **2006**; 11(2):131–7.
- [205] Romero-Oliva F., Jacob G., Allende J. E., "Dual effect of lysine-rich polypeptides on the activity of protein kinase CK2" *J Cell Biochem* **2003**; 89(2):348–55.
- [206] Battistutta R., de Moliner E., Sarno S., Zanotti G., Pinna L. A., "Structural features underlying selective inhibition of protein kinase CK2 by ATP site-directed tetrabromo-2-benzotriazole" *Protein Sci* **2001**; 10(11):2200–6.
- [207] Sarno S., Marin O., Meggio F., Pinna L. A., "Polyamines as negative regulators of casein kinase-2: the phosphorylation of calmodulin triggered by polylysine and by the α [66-86] peptide is prevented by spermine" *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1993**; 194(1):83–90.
- [208] Maenpaa P. H., "Effects of polyamines and polyanions on a cyclic nucleotide-independent and a cyclic AMP-dependent protein kinase" *Biochim Biophys Acta* **1977**; 498(1):294–305.
- [209] Cochet C., Job D., Pirollet F., Chambaz E. M., "Adenosine 3',5'-monophosphate-independent protein kinase activities in the bovine adrenal cortex cytosol" *Endocrinology* **1980**; 106(3):750–7.
- [210] Leroy D., Heriche J.-K., Filhol O., Chambaz E. M., Cochet C., "Binding of polyamines to an autonomous domain of the regulatory subunit of protein kinase CK2 induces a conformational change in the holoenzyme: A proposed role for the kinase stimulation" *Journal of Biological Chemistry* **1997**; 272(33):20820–7.
- [211] Walz K., Pardo P. S., Passeron S., "Purification and characterization of protein kinase CK2 from *Candida albicans*: evidence for the presence of two distinct regulatory subunits β and β' " *Arch Biochem Biophys* **1997**; 340(2):347–54.
- [212] Bidwai A. P., Reed J. C., Glover C. V., "Cloning and disruption of CKB1, the gene encoding the 38-kDa β subunit of *Saccharomyces cerevisiae* casein kinase II (CKII). Deletion of CKII regulatory subunits elicits a salt-sensitive phenotype" *J Biol Chem* **1995**; 270(18):10395–404.
- [213] Kohfeldt E., Maurer P., Vannahme C., Timpl R., "Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican" *FEBS Lett* **1997**; 414(3):557–61.

9 Anhang

9.1 Expressionsvektoren

9.1.1 pT7-7

Zur Expression der Proteine *hsCK2α*¹⁻³³⁵ und *hsCK2β*¹⁻¹⁹³ in *E. coli* wurde der Vektor pT7-7 verwendet (Abb. 67). Dieser beinhaltet einen T7-RNA-Polymerase-Promotor, ein Ampicillinresistenzgen, den ColE1 Replikationsursprung, eine Ribosomenbindungsstelle (rbs) und ein Startkodon (ATG) vor der Polylinker-Sequenz.

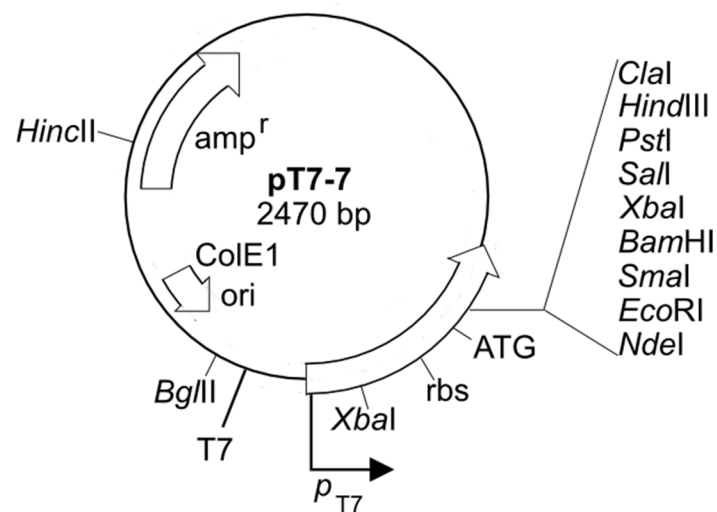


Abb. 67 Aufbau des Expressionsvektors pT7-7

9.1.2 pETDuet-1

Zur Expression der *hsCK2α*^{C336S} in *E. coli* wurde der Vektor pETDuet-1 verwendet (Abb. 68). Dieser beinhaltet zwei T7-RNA-Polymerase-Promotor für zwei Polylinker-Sequenzen (MCS), ein Ampicillinresistenzgen, den lac Operator, eine Ribosomenbindungsstelle (rbs) und zwei Startkodons (ATG) vor den Polylinker-Sequenzen (MCS).

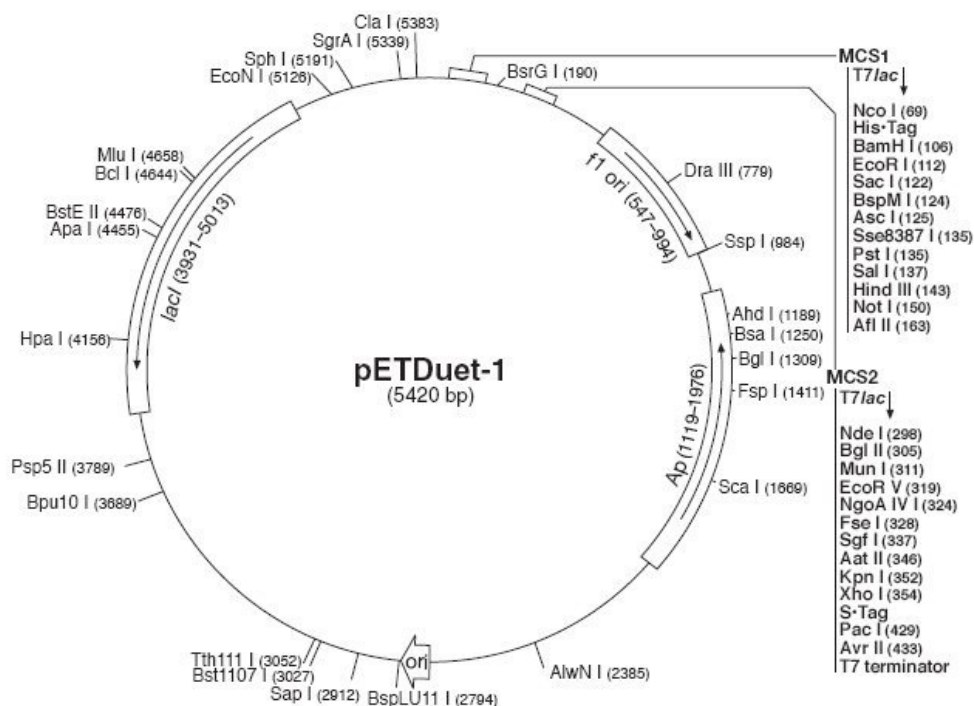


Abb. 68 Aufbau des Expressionsvektors pETDuet-1

9.1.3 pV152

Der Expressionsvektor pV152 (pCEP-Pu/BM40SP/C-Strep) wurde im Institut für Biochemie II der Universitätsklinik Köln ausgehen vom pCEP4 (Invitrogen, Abb. 69) modifiziert. Es wurde ein Puromycinresistenzgen gegen ein Hygromycinresistenzgen ausgetauscht sowie eine Sequenz, die für einen C-terminalen Doppel-Streptag-II codiert, eingeführt [213].

Zur Expression der Proteine in HEK293-EBNA-Zellen wurde der Vektor pV152 verwendet. Dieser beinhaltet einen CMV-Promotor ein Ampicillinresistenzgen, ein Puromycinresistenzgen, das Epstein-Barr Virus Replikationsursprung (oriP) und ein nukleares Antigen (codiert durch das EBNA-1 Gen).

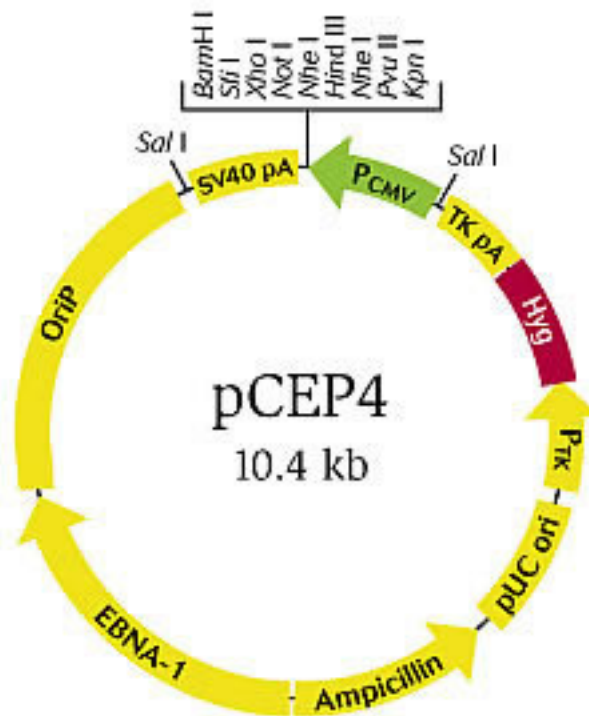


Abb. 69 Aufbau des pCEP4

9.2 Analytische Agarosegele nach Restriktionsverdau der Plasmidpräparation

9.2.1 Restriktionsverdau zur Kontrolle des *hsCK2 α_{Hek}* -Konstrukts

In Abb. 70 ist das Agarosegel des Restriktionsverdaus mit EcoRV der Plasmidpräparation für das *hsCK2 α_{Hek}* -Konstrukt zu sehen. Auf der rechten Seite ist ein theoretische Verdau des Konstrukts mit dem NEBcutter V2.0 der Firma New England Biolabs, USA zu sehen. Mit diesem wurde EcoRV für einen theoretischen Restriktionsverdau ausgewählt und dabei wurden die theoretischen Banden für das *hsCK2 α_{Hek}* -Konstrukt berechnet. (s. Tab. 40) Plasmidpräparationen, welche mit dem theoretischen Restriktionsverdau übereinstimmten wurden für eine weitere Sequenzierung ausgewählt. Mindestens einer dieser Plasmide zeigte nach erfolgreicher Sequenzierung die richtige Sequenz für *hsCK2 α_{Hek}* in pV152.

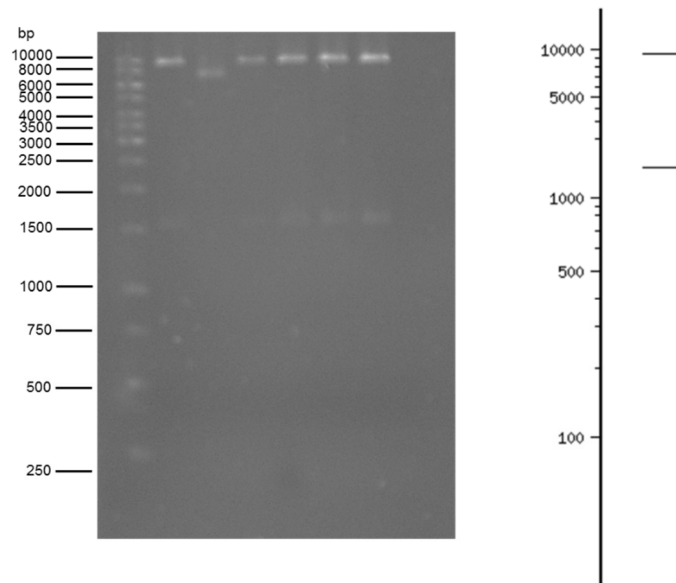


Abb. 70 Restriktionsverdau der Plasmidpräparation des *hsCK2α_{Hek}*-Konstrukts.

Die Abbildung zeigt ein analytisches Agarosegel nach Restriktionsverdau mit EcoRV der Plasmidpräparation von *hsCK2α_{Hek}*. Rechts ist das theoretische Gel nach Verdau zu sehen.

Tab. 40 Berechnete Größen der Banden des *hsCK2α_{Hek}*-Konstrukts nach Restriktionsverdau mit EcoRV

	Basenpaare (bp)
1	9380
2	1373

9.2.2 Restriktionsverdau zur Kontrolle des *hsCK2α¹⁻³³⁵_{Hek}*-Konstrukts

In Abb. 71 ist das Agarosegel des Restriktionsverdaus mit EcoRV der Plasmidpräparation für das *hsCK2α¹⁻³³⁵_{Hek}*-Konstrukt zu sehen. Rechts vom Agarosegel ist ein theoretische Verdau des Konstrukts mit dem NEBcutter V2.0 der Firma New England Biolabs, USA zu sehen. Mit Hilfe dieses Programms wurde EcoRV als Restriktionsenzym für das *hsCK2α¹⁻³³⁵_{Hek}*-Konstrukt ausgewählt und so die theoretischen Banden (s. Tab. 41) für das Agarosegel berechnet. Plasmidpräparationen, welche mit dem theoretischen Restriktionsverdau übereinstimmten wurden für eine weitere Sequenzierung ausgewählt. Mindestens einer dieser Plasmide zeigte nach erfolgreicher Sequenzierung die richtige Sequenz für *hsCK2α¹⁻³³⁵_{Hek}* in pV152.

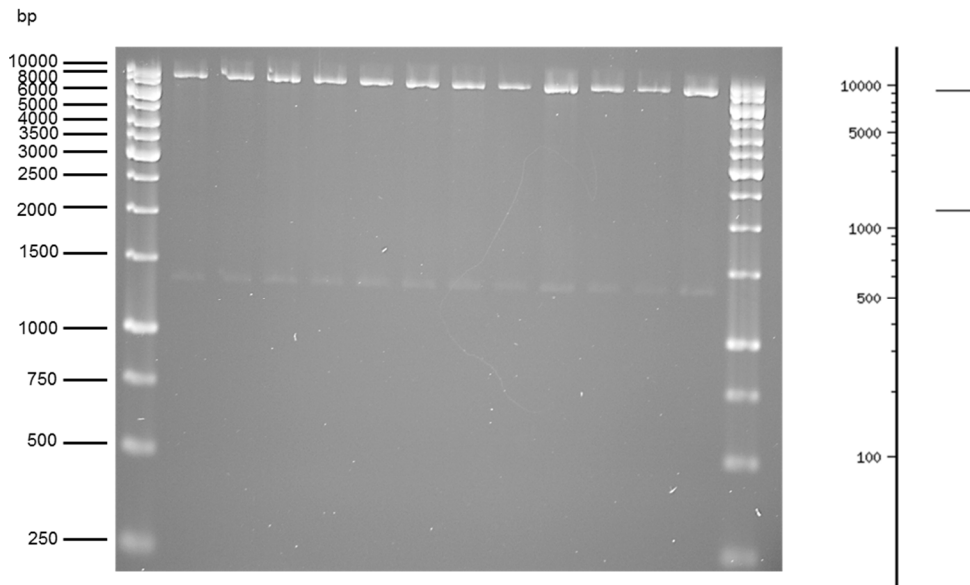


Abb. 71 Restriktionsverdau der Plasmidpräparation des $hsCK2\alpha^{1-335}_{Hek}$ -Konstrukts.

Die Abbildung zeigt ein analytisches Agarosegel nach Restriktionsverdau mit EcoRV der Plasmidpräparation von $hsCK2\alpha^{1-335}_{Hek}$. Rechts ist das theoretische Gel nach Verdau zu sehen.

Tab. 41 Berechnete Größen der Banden des $hsCK2\alpha^{1-335}_{Hek}$ -Konstrukts nach Restriktionsverdau mit EcoRv

	Basenpaare (bp)
1	9380
2	1205

9.2.3 Restriktionsverdau zur Kontrolle des $hsCK2\beta^{1-193}_{Hek}$ -Konstrukts

In Abb. 72 ist ein Agarosegel des Restriktionsverdaus mit PstI der Plasmidpräparation für das $hsCK2\beta^{1-193}_{Hek}$ -Konstrukt zu sehen. Auf der rechten Seite ist ein theoretische Verdau mit PstI des Konstrukts mit Hilfe des NEBcutter V2.0 der Firma New England Biolabs, USA zu sehen. Dieses Programm hat die theoretischen Banden für einen Restriktionsverdau mit PstI berechnet (s. Tab. 42). Plasmidpräparationen, welche mit dem theoretischen Restriktionsverdau übereinstimmten wurden für eine weitere Sequenzierung ausgewählt. Mindestens einer dieser Plasmide zeigte nach erfolgreicher Sequenzierung die richtige Sequenz für $hsCK2\beta^{1-193}_{Hek}$ in pV152.

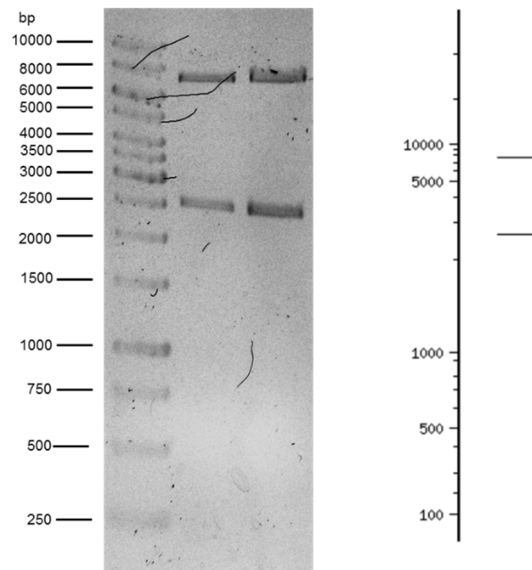


Abb. 72 Restriktionsverdau der Plasmidpräparation des *hsCK2β*¹⁻¹⁹³_{Hek}-Konstrukts.

Die Abbildung zeigt ein analytisches Agarosegel nach Restriktionsverdau mit PstI der Plasmidpräparation von *hsCK2β*¹⁻¹⁹³_{Hek}. Rechts ist das theoretische Gel nach Verdau zu sehen.

Tab. 42 Berechnete Größen der Banden des *hsCK2β*¹⁻¹⁹³_{Hek}-Konstrukts nach Restriktionsverdau mit PstI

	Basenpaare (bp)
1	7588
2	2583

9.2.4 Restriktionsverdau zur Kontrolle des *hsCK2α*^{C336S}_{Hek}-Konstrukts

In Abb. 73 ist das Agarosegel des Restriktionsverdaus mit PstI der Plasmidpräparation für das *hsCK2α*^{C336S}_{Hek}-Konstrukt zu sehen. Auf der rechten Seite ist ein Gel eines theoretischen Verdaus des Konstrukts mit PstI, berechnet mit dem NEBcutter V2.0 der Firma New England Biolabs, USA, zu sehen. Plasmidpräparationen, welche mit dem theoretischen Restriktionsverdau übereinstimmten wurden für eine weitere Sequenzierung ausgewählt. Mindestens einer dieser Plasmide zeigte nach erfolgreicher Sequenzierung die richtige Sequenz für *hsCK2α*^{C336S}_{Hek} in pV152.

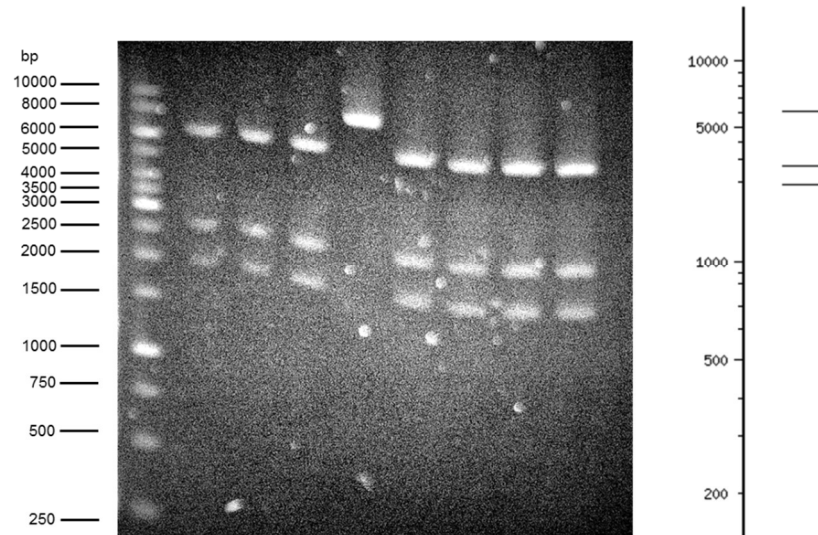


Abb. 73 Restriktionsverdau der Plasmidpräparation des $hsCK2\alpha^{C336S}_{Hek}$ -Konstrukts.

Die Abbildung zeigt ein analytisches Agarosegel nach Restriktionsverdau mit PstI der Plasmidpräparation von $hsCK2\alpha^{C336S}_{Hek}$. Rechts ist das theoretische Gel nach Verdau zu sehen.

Tab. 43 Berechnete Größen der Banden des $hsCK2\alpha^{C336S}_{Hek}$ -Konstrukts nach Restriktionsverdau mit PstI

	Basenpaare (bp)
1	6111
2	2583
3	1936

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Karsten Niefind betreut worden.

Michaela Steinkrüger

28.09.2017

Teilpublikationen:

"Development of a high-throughput screening-compatible assay to identify inhibitors of the CK2alpha/CK2beta interaction" Jennifer Hochscherf, Dirk Lindenblatt, Michaela Steinkrüger, Eungyoung Yoo, Özlem Ulucan, Stefan Herzig, Olaf-Georg Issinger, Volkhard Helms, Claudia Götz, Ines Neundorf, Karsten Niefind, Markus Pietsch *Anal Biochem* **2015**; 468:4–14.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Anschrift: Michaela Steinkrüger
Preußerstr. 3
24768 Rendsburh

Geburtsdatum 11. Januar 1987

Geburtsort Leverkusen, NRW

Familienstand ledig

Schulbildung

1993 – 1997 GGS Leuchter Straße, Köln, NRW

1997 – 2006 Hölderlin Gymnasium, Köln-Mülheim, NRW

- Abschluss: Abitur

Ausbildung

08/2006 - 06/2008 Berufsausbildung zu Chemielaborantin Currenta GmbH & Co.KG

- Abschluss: IHK-Prüfung zur Chemielaborantin

Akademischer Werdegang

09/2006 – 08/2010 Bachelorstudium in Chemie und Biotechnologie an der HS Niederrhein, Krefeld

- Abschluss: Bachelor of Science

10/2010 – 03/2013 Masterstudium Medicinal Chemistry an der Universität Regensburg

- Abschluss: Master of Science

Seit 05/2013 Doktorandin am Department für Chemie der Universität zu Köln und dem Zentrum für Pharmakologie der Uniklinik Köln und Mitglied im Graduiertenkolleg für Pharmakologie und angewandte Therapie der Uniklinik Köln und Bayer HealthCare

Studienbegleitende Praktika

03/2010 – 08/2010 Praktikum zur Erstellung der Bachelorarbeit bei der Cognis GmbH, Düsseldorf

- Thema: „Selektive Synthese von racemischen 6-Prenyl- und 6-Geranylnaringenin.“

01/2012-03/2013 Praktikum zur Erstellung der Masterarbeit im Zentrum für Pharmakologie der Uniklinik Köln

- Thema: „Identifizierung neuartiger Inhibitoren der Cholesterolesterase aus porcinem und bovinem Pankreas.“

Konferenzteilnahmen

- | | |
|---------|--|
| 03/2014 | GdCh Frontiers in Medicinal Chemistry, Tübingen <ul style="list-style-type: none"> • Poster Präsentation: Novel cyclic peptides addressing the CK2α/CK2β subunit interaction site of protein kinase CK2 |
| 09/2014 | 7th Summerschool "Medicinal Chemistry" des DFG-Graduiertenkollegs GRK 1910 "Medicinal Chemistry of Selective GPCR Ligands", Regensburg <ul style="list-style-type: none"> • Poster Präsentation und Vortrag: Novel Cyclic Peptides Addressing the CK2α/CK2β Subunit Interaction Site of Protein Kinase CK2 |
| 05/2014 | GTC Europe Drug Discovery Summit, Berlin <ul style="list-style-type: none"> • Freiwillige HelferIn |
| 02/2015 | GTC Enzymes in Drug Discovery Summit, San Diego <ul style="list-style-type: none"> • Poster Präsentation und Vortrag: Novel cyclic peptides addressing the CK2α/CK2β subunit interaction site of protein kinase CK2 |
| 05/2015 | GTC Europe Drug Discover Drug Summit, Berlin <ul style="list-style-type: none"> • Poster Präsentation: New Inhibitors of the Protein Kinase CK2 Subunit Interaction |
| 09/2016 | 8th International Conference on Protein Kinase CK2, Homburg <ul style="list-style-type: none"> • Poster Präsentation und Vortrag: New Inhibitors of the Protein Kinase CK2 Subunit Interaction |